

ELISABETE LILIAN DAIR

**EFEITOS DA MELATONINA NOS NÍVEIS DE IGF-I E ESTERÓIDES SEXUAIS E
NO SISTEMA REPRODUTOR (OVÁRIOS E ÚTERO) DE RATAS ADULTAS**

Tese apresentada ao Departamento de
Ginecologia da Universidade Federal de
São Paulo para obtenção do título de Doutor
em Ciências.

São Paulo
2007

ELISABETE LILIAN DAIR

**EFEITOS DA MELATONINA NOS NÍVEIS DE IGF-I E ESTERÓIDES SEXUAIS E
NO SISTEMA REPRODUTOR (OVÁRIOS E ÚTERO) DE RATAS ADULTAS**

Tese apresentada ao Departamento de
Ginecologia da Universidade Federal de
São Paulo para obtenção do título de Doutor
em Ciências.

Orientador:

Prof. Dr. José Maria Soares Júnior

Co-orientadores:

Prof. Dr. Edmund Chada Baracat

Prof. Dr. Manuel de Jesus Simões

São Paulo
2007

Dair, Elisabete Lilian

EFEITOS DA MELATONINA NOS NÍVEIS DE IGF-I E ESTERÓIDES SEXUAIS E NO SISTEMA REPRODUTOR (OVÁRIOS E ÚTERO) DE RATAS ADULTAS/ Elisabete Lilian Dair - São Paulo, 2007.

87f.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de São Paulo - Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Ginecologia.

Título em Inglês: Effects of melatonin on the IGF-I and sexual steroids levels and reproductive system (ovaries and uterus) of adult rats

1. Melatonina 2. Pinealectomia 3. Luz contínua 4. Sistema reprodutor 5. IGF-I.

DEDICATÓRIA

Este trabalho é dedicado:

Ao meu marido, **MARCELO**, à minha mãe, **MARLENE**, e à minha irmã, **RENATA**,
pelo companheirismo e amor com que me acompanharam e que me deram fôlego
para vencer as dificuldades.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao Prof. Dr. **JOSÉ MARIA SOARES JÚNIOR**, Professor Adjunto da Disciplina Endocrinologia Ginecológica do Departamento de Ginecologia da Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina, pela amizade, paciência e precioso auxílio.

Ao Prof. Dr. **EDMUND CHADA BARACAT**, Professor Titular do Departamento de Ginecologia da Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina e Professor Titular do Departamento de Obstetrícia e Ginecologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo pela confiança, exemplo acadêmico e profissional.

Ao Prof. Dr. **MARCO FÁBIO PRATA LIMA**, Professor Adjunto da Disciplina de Ginecologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, pelo carinho e estímulo que sempre me levaram a acreditar que vale a pena lutar por algo maior e por seu exemplo de entusiasmo científico.

Ao Prof. Dr. **MANUEL DE JESUS SIMÕES**, Professor Livre-Docente Associado da Disciplina de Histologia e Biologia Celular do Departamento de Morfologia da Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina, por seu importante apoio.

Ao Prof. Dr. **LUIZ CARLOS DOS REIS**, Professor Titular da Disciplina de Fisiologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, pela preciosa ajuda nesta pesquisa, principalmente na coleta do material e manuseio dos animais.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. **VIRMONDES RODRIGUES JÚNIOR**, Professor Titular da Disciplina de Imunologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, pela atenção e importante ajuda no período de coleta e armazenamento dos materiais.

Aos Professores da Disciplina de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, **EDDIE FERNANDO CÂNDIDO MURTA, JOÃO ULISSES RIBEIRO, MARIA AZNIV H. SOUZA e RESALLA SALUM** (*in memorian*), pela minha formação acadêmica e profissional.

A Profa. **SHEILA ADAD**, Professora Adjunta da Disciplina de Patologia Especial da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, que nos abriu a porta de seu laboratório para o processamento do material.

Ao Prof. Dr. **GERALDO RODRIGUES DE LIMA**, Professor Titular do Departamento de Ginecologia da Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina, por seu exemplo de compromisso científico como médico e professor.

Ao Prof. Dr. **MAURO ABI HAIDAR**, Professor Livre-Docente Associado da Disciplina de Endocrinologia Ginecológica do Departamento de Ginecologia da Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina, pelo apoio durante os anos que estive no ambulatório de Ginecologia Endócrina e Climatério.

A todos os Professores do Departamento de Ginecologia da Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina, pela dedicação ao ensino e contribuição no aprimoramento da minha formação ginecológica.

À Dra. **MAGDA BIGNOTTO** do Departamento de Psicobiologia da UNIFESP-AFIP, pela enorme compreensão e colaboração durante todo o processo de dosagem hormonal.

Ao Prof. Dr. **ISMAEL DALE COTRIN GUERREIRO DA SILVA**, Professor Livre-Docente do Departamento de Ginecologia da Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina por sua ajuda e compreensão no armazenamento dos materiais.

À **KARIN MARTINS DOS SANTOS**, secretária da Pós-graduação da UNIFESP, pela disponibilidade e atenção.

Às secretárias do Departamento de Ginecologia da UNIFESP – Escola Paulista de Medicina: **VALÉRIA DOS SANTOS MEDINA**, **ZÉLIA MARIA GOMES MACEDO**, **MARIA CECÍLIA DOS SANTOS SILVA**, do Departamento de Ginecologia da UNIFESP - EPM, pela ajuda imensa.

À **VIVIANE MATOS** e à **KELLY CRISTINA**, secretárias da Disciplina de ginecologia e obstetrícia da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, pela amizade e simpatia sempre presentes.

Aos funcionários da Disciplina de Fisiologia e Imunologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, em especial ao **CARLOS MOTA**, pela grande ajuda, inclusive nos feriados e finais de semana, sem a qual não seria possível o processamento e armazenamento adequado dos materiais.

À **CAPES**, cuja bolsa de doutorado permitiu-me realizar esta tese.

Aos **ANIMAIS SACRIFICADOS DURANTE A TESE**, pela contribuição para pesquisa que, certamente, ajudará o ser humano.

RESUMO

A pineal é aceita como reguladora da reprodução em mamíferos, por sua capacidade de interagir com as gonadotrofinas e influenciar as gônadas e promover a ciclicidade estral em algumas espécies. Contudo, sua função em espécies não foto-periódicas (camundongo, rato, macaco e ser humano) ainda não está totalmente esclarecida. Por este motivo, propusemo-nos a avaliar a histomorfologia e a histomorfometria do sistema reprodutor (ovários e útero), bem como os níveis plasmáticos de IGF-I e dos esteróides sexuais em ratas pinealectomizadas ou mantidas sob estímulo luminoso contínuo e após o tratamento com melatonina.

Foram utilizadas ratas albinas, adultas, virgens, pesando aproximadamente 250g, da linhagem EPM - 1 Wistar. As ratas foram divididas, aleatoriamente, em seis grupos, a saber: GI – controle, tratado com veículo (n=20); GII – falsamente pinealectomizado, *sham*, tratado com veículo (n=20); GIII – pinealectomizado e tratado com veículo (n=20); GIV - pinealectomizado e tratado com melatonina (n=20); GV - submetido à luz contínua e tratado com veículo (n= 20); GVI – submetido à luz contínua e tratado com melatonina (n=20). O tratamento com melatonina (GIV e GVI) foi realizado por 90 dias consecutivos. Na noite anterior ao término do estudo, os animais foram colocados em gaiolas metabólicas, coletando-se a urina noturna. Posteriormente, o sangue foi retirado pelo plexo ocular nos animais para determinação hormonal. Em seguida, as ratas foram sacrificadas e os ovários e o útero foram removidos para análise histomorfológica e histomorfométrica.

Observou-se que a redução dos níveis séricos da melatonina (pela pinealectomia ou luz contínua, grupos III e V, respectivamente) determinou elevação sérica de estrogênio e redução significativa de progesterona e IGF-I. Já a reposição com melatonina, reverteu este estado nos animais pinealectomizados, mas não nos animais sob luz contínua (grupo VI). Houve diminuição dos níveis androgênicos nos

animais que receberam melatonina (grupos IV e VI) em relação os animais com baixos níveis de melatonina (grupos III e V).

A diminuição sérica de melatonina (grupos III e V) determinou a proliferação do endométrio. Este efeito não foi totalmente bloqueado nos animais submetidos à luz contínua ou à pinealectomia e que foram tratados com melatonina. A diminuição dos níveis de melatonina determina alterações histomorfológicas e histomorfométricas nos ovários, sendo que a reposição de melatonina restaura essas modificações nos folículos ovarianos, bem como no epitélio e no estroma (células intersticiais). Contudo, o efeito desse hormônio tem menor impacto no epitélio superficial do ovário dos animais sob luz contínua.

Nossos dados sugerem que a melatonina interfere com a produção hormonal e o sistema reprodutor, mas não é efetiva em animais sob luz contínua; possivelmente outros mecanismos que possam estar envolvidos sejam independentes da pineal.

ABSTRACT

The pineal gland is accepted as the reproduction modulator in mammals but its function in non-photoperiodic species (mouse, rat and primate) is still not thoroughly clear considering the endocrine interactions are fairly complex. For this reason, we have proposed to evaluate the histomorphology of the reproductive system (ovary and uterus) as well as the plasmatic levels of IGF-I and the sexual steroids in pinealectomized female rats or kept under continuous luminous stimulus and after the treatment using melatonin.

The albino virgo female rats weighed approximately 250g from the EPM lineage – 1 Wistar were randomly divided into six groups: GI – control treated with vehicle (n=20); GII – falsely pinealectomized, *sham*, and treated with vehicle (n=20); GIII – pinealectomized and treated with vehicle (n=20); GIV – pinealectomized and treated with melatonin (n=20); GV – submitted to continuous light and treated with vehicle (n=20); GVI – submitted to continuous light and treated with melatonin (n=20). The treatment using melatonin for these groups lasted 90 consecutive days. The night before the end of the study, the animals were put in metabolic cages to collect urine. Later, the blood was taken through the ocular plexus for the hormonal determination. Then, both the ovary and the uterus of the female rats were removed for a histomorphological and histomorphometric analyses.

The reduction of the serum levels of melatonin (pinealectomy or continuous light) as followed by an increase in estrogen levels and a significant reduction in progesterone and IGF-I blood levels. Differently, the replacement with melatonin reverted this condition in the pinealectomized animals but this did not happen with the animals exposed to continuous light. There was a reduction in the androgenic levels when compared to animals with low levels of melatonin.

The reduction in serum melatonin is related to the endometrial proliferation. This effect is not totally blocked in animals submitted to continuous light or pinealectomy, which were treated with melatonin. Also, the decrease in the melatonin levels determined histomorphologic changes in the ovaries and the melatonin replacement restored these alterations in the ovarian follicle as well as in the epithelium and in the ovarian stroma (interstitial cells). Nevertheless, the effect of this hormone has a smaller impact in the ovarian superficial epithelium in animals under continuous light.

Our data suggest that melatonin interferes with the hormone production and the reproductive system, but this is not the case in animals under continuous light; it is possible that other mechanisms, which may be involved are regardless of the pineal.

SUMÁRIO

Dedicatória.....	i
Agradecimentos Especiais.....	iii
Agradecimentos	v
Resumo	ix
Abstract	xii
Sumário.....	xv
Lista de Tabelas	xvii
Lista de Figuras	xix
1 – Introdução.....	1
2 – Proposição.....	12
3 – Material e Métodos	14
4 – Resultados	24
5 – Discussão	45
6 – Conclusão	54
7 – Referências Bibliográficas	56
8 - Anexos	74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Médias e erros-padrão das determinações urinárias de 6-sulfatoximelatonina (6-SMT) e dos níveis séricos de IGF-1, estradiol, progesterona e testosterona total nos grupos estudados.....	26
Tabela 2 - Médias e erros-padrão dos parâmetros histomorfométricos avaliados nos ovários de ratas nos grupos estudados.....	33
Tabela 3 - Médias e desvios-padrão dos parâmetros histomorfométricos no útero de rata nos grupos estudados.....	42

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Determinação urinária de 6-sulfatoximelatonina (6-SMT) por radioimunoensaio	27
Figura 2 - Determinação sérica de fator de crescimento insulinóide tipo I (IGF-I) por radioimunoensaio	27
Figura 3 - Determinação sérica de estradiol por radioimunoensaio.....	28
Figura 4 - Determinação sérica de progesterona por radioimunoensaio	28
Figura 5 - Determinação sérica de testosterona total por radioimunoensaio.....	29
Figura 6 - Fotomicrografia de cortes histológicos do ovário de rata	30
Figura 7 - Fotomicrografia de cortes histológicos do ovário de rata	32
Figura 8 - Representação gráfica da espessura do epitélio superficial do ovário.....	34
Figura 9 - Representação gráfica do número de mitose no epitélio de revestimento ovariano	34
Figura 10 - Representação gráfica do número de células intersticiais no estroma do ovário	35
Figura 11 - Representação gráfica do número de mitose em 10 folículos secundários.....	35
Figura 12 - Fotomicrografia de corte histológico do útero de rata no grupo I durante o proestro	36
Figura 13 - Fotomicrografia de corte histológico do útero de rata no grupo II durante o proestro	37
Figura 14 - Fotomicrografia de corte histológico do útero de rata no grupo III durante o proestro	38
Figura 15 - Fotomicrografia de corte histológico do útero de rata no grupo IV durante o proestro	39
Figura 16 - Fotomicrografia de corte histológico do útero de rata no grupo V durante o proestro	40
Figura 17 - Fotomicrografia de corte histológico do útero de rata no grupo VI durante o proestro	41
Figura 18 - Representação gráfica da espessura endometrial nos grupos estudados..	42
Figura 19 - Representação gráfica da espessura do epitélio luminal nos grupos estudados.....	43
Figura 20 - Representação gráfica do número de eosinófilos por 10 campos microscópicos nos grupos estudados	43
Figura 21 - Representação gráfica da espessura miometrial nos grupos estudados.....	44

1- INTRODUÇÃO

O rato é um animal mamífero com reprodução não-sazonal, semelhante à mulher e aos primatas, ou seja, não tem períodos específicos de fertilidade durante o ano. A fêmea tem ciclo estral curto (4 a 5 dias), bem definido (proestro, estro, metaestro e diestro), sendo fácil seu controle pelo esfregaço de células vaginais. Outra vantagem é sua sensibilidade ao ritmo circadiano, sendo, desta forma, o animal mais utilizado em pesquisas relacionadas à reprodução (FREEMAN, 1994). Além disso, outros autores o empregaram para o estudo dos efeitos da melatonina (DARDES et al., 2000; DAIR, 2001; SOARES Jr. et al., 2003a, b; PRATA LIMA et al., 2004; TEIXEIRA et al., 2004). Por este motivo, foi escolhido como modelo experimental para avaliar a ação da melatonina no sistema reprodutor.

A primeira fase do ciclo estral da rata, denominada proestro, ocorre quando o animal se prepara para o acasalamento, apresentando pico do hormônio folículo estimulante (FSH), hormônio luteinizante (LH), prolactina (PRL), androgênios, estradiol e progesterona. Segue-se a fase de estro e, na ausência de fecundação, ocorre a terceira fase, o metaestro, na qual há o processo de involução, principalmente do útero e da vagina, com invasão leucocitária intensa. A última fase é o diestro, quando o endométrio, novamente, começa a ser preparado para um novo ciclo (SMITH et al., 1975).

O exame colpocitológico constitui a melhor forma de controle das fases do ciclo estral devido à facilidade e à grande confiabilidade em determinar as células das camadas profundas, médias e superficiais. Através deste exame pode-se, também, realizar o diagnóstico ou não de infiltrado leucocitário e muco (CAMANO & GIUFFRIDA, 1970). Na fase de estro, por exemplo, encontram-se células grandes, poligonais, anucleadas, acidófilas e queratinizadas, as quais advêm da intensa ação

estrogênica prévia, apresentando duração de aproximadamente 20 horas (SIMÕES, 1979).

Estudos prévios em nosso Departamento e na literatura, utilizando modelo experimental semelhante ao empregado em nosso estudo, demonstraram que a pineal teria importante ação no sistema reprodutivo (SOARES Jr. et al., 2003a, b; PRATA LIMA et al., 2004; TEIXEIRA et al., 2004).

A pineal, glândula amplamente aceita como moduladora da reprodução em mamíferos, apresenta capacidade de influenciar as gônadas e a ciclicidade estral (OJEDA & URBANSKI, 1994; SOARES Jr. et al., 2003a). Sua atividade pode ser avaliada pelos níveis séricos de melatonina, os quais variam de acordo com as diferentes fases do ciclo estral da rata e apresentam os maiores valores durante a noite (JOHNSON et al., 1982).

A melatonina é o principal produto da pineal, sendo conhecida, farmacologicamente, como N-acetil-5-metoxitriptamina (indolamina com peso molecular de 232,2). Seu metabolismo inicia-se com a captação do triptofano, o qual é o principal precursor das indolaminas. Os níveis intracelulares de triptofano aumentam durante o período de luz, enquanto os da melatonina elevam-se durante a noite (ERLICH & APUZZO, 1985; MASANA & DUBOCOVICH, 2001), com ápice ao redor da meia-noite. Posteriormente, há queda durante o dia, quando se detectam os menores níveis séricos desse hormônio (REICHLIN, 1992).

Os efeitos da melatonina na função gonadal dependem, sobretudo, da espécie estudada. Em animais sazonais, como a ovelha e o hamster, esse hormônio teria ação pró-gonadotrófica (SOARES Jr. et al., 2003a). A ação antigonadotrófica foi demonstrada (MASANA et al., 2005) nos animais não-sazonais, em que a fertilidade

não se relaciona com as estações do ano, como o homem, os primatas e alguns roedores, como o camundongo e o rato (SOARES Jr. et al., 2003a).

Ratas mantidas sob iluminação constante (produção reduzida de melatonina) teriam alongamento do ciclo estral (maior incidência da fase de estro). No entanto, a ministração exógena de melatonina em animais pinealectomizados ou mantidos sob iluminação constante, apresenta efeito contrário, regularizando o ciclo (WURTMAN et al., 1964; GITTES & CHU, 1965). De maneira similar, a pinealectomia, em geral, aumenta a incidência de estro e prolonga a duração do ciclo em ratas que previamente apresentavam ciclos estrais regulares (PRATA LIMA, 1998). DARDES et al. (2000) mostraram que há queda do nível de hormônio folículo estimulante (FSH) após a retirada da pineal, o que poderia comprometer a função folicular e a produção hormonal ovariana.

Sabe-se ainda que o implante de melatonina na eminência média do hipotálamo determina diminuição dos níveis do hormônio luteinizante (LH) e, em consequência, bloqueio gonadotrófico em ratas (REITER, 1986). BHAGAT et al. (1994) detectaram queda dos níveis séricos de FSH e LH em ratas submetidas à ooforectomia unilateral e subsequentemente tratadas com melatonina. Este fato sugere ação deste hormônio em níveis hipotalâmicos ou em centros corticais superiores.

Adicionalmente, AYRE e PANG (1994) sugeriram que a ação da melatonina seria mais complexa, podendo apresentar efeito pró-gonadotrófico, dependendo da região do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal estudado, da quantidade de melatonina ministrada e do estado hormonal da rata. Assim, OCAL-IREZ et al. (1989) observaram que a injeção diária de 10 a 20 µg de melatonina em ratas imaturas, durante 28 dias consecutivos, ocasionou abertura vaginal precoce e diminuição

significativa do peso ovariano. Já LEWINSKI et al. (1993) relataram que a melatonina diminuiu o peso ovariano e inibiu a hipertrofia compensatória do ovário remanescente após ooforectomia unilateral em ratas com ciclo estral regular (efeito antigonadotrófico). Reforçando essa hipótese, vários autores crêem que a ministração exógena de melatonina (em dose semelhante à fisiológica) teria efeito antigonadotrófico (TAMARKIN et al., 1977; ROLLAG et al., 1980; REITER, 1986).

WURTMAN e OZAKI (1978) mostraram que as concentrações séricas de estrogênio e progesterona teriam influência sobre a melatonina. Nesse estudo verificaram em ratas que, após ooforectomia, havia aumento dos níveis de melatonina, enquanto que a ministração dos esteróides ovarianos diminuía a produção da mesma. Além disso, em meio de cultura de pinealócitos de ratas, ALONSO-SOLIS et al. (1995) registraram que os esteróides ovarianos modulariam os receptores adrenérgicos, regularizando a produção de melatonina. Ademais, em ratas adultas, há receptores esteroídicos na superfície da pineal que interagem com os adrenorreceptores $\alpha 1$ e β , modulando a síntese de melatonina durante o ciclo estral (SUGDEN, 1989).

Em 1997, WHITE et al. notaram que o estradiol modularia positivamente a produção de melatonina em ratas adultas, refletindo na função da pineal. Nesse trabalho, os níveis de 6-sulfatoximelatonina (6SMT) encontravam-se elevados no período de proestro (fase periovulatória), fase que apresenta a máxima secreção estrogênica. Além disso, JOHNSON et al. (1982) relataram baixos níveis de melatonina durante a fase de estro, e altos índices nas noites das fases de metaestro e diestro. Em ratas ooforectomizadas, OZAKI et al. (1978) observaram redução dos níveis de melatonina após a ministração de estrogênio e progesterona.

Por muito tempo, o conhecimento da ação da melatonina esteve restrito ao sistema nervoso central. Contudo, o interesse da melatonina diretamente nas gônadas aumentou muito nos últimos anos com a identificação de sítios de ligação da melatonina (SIROTKIN & SCHAEFFER, 1997) e da caracterização do receptor de melatonina em ovários de ratas (SOARES Jr. et al., 2003a). Além disso, alterações dos níveis séricos de melatonina estão relacionados com distúrbios da ovulação em mulheres (LUBOSHITZKY et al., 2003), bem como em ratas (PRATA LIMA et al., 2004).

VOORDOUW et al. (1992) observaram, após ministrarem melatonina isolada ou associada à progestagênio em mulheres, efeito sinérgico ou adicional entre a melatonina e o progestagênio na inibição da função ovariana, sem alterar o ritmo sono-vigília. Sugeriram que a melatonina em associação com progestagênio teria ação contraceptiva. LUBOSHITZKY et al., 2003, notaram que mulheres com síndrome dos ovários policísticos (SOP) teriam níveis séricos de melatonina maiores do que as normais ou com hirsutismo idiopático.

PRATA LIMA (1998) e PRATA LIMA et al. (2004) comprovaram alterações histomorfológicas importantes nos ovários de ratas após pinealectomia. Em muitos animais, detectaram a presença de policistose ovariana. Nesse particular, SOARES Jr. et al. (2003a) identificaram aumento do número e do volume das glândulas intersticiais e diminuição do número de corpo lúteo dos ovários de ratas após a remoção da pineal. Esses trabalhos sugerem haver menor taxa de ovulação nestes animais. Além disso, DAIR (2001) e LANG (2001) demonstraram que a redução sérica de melatonina após a remoção da pineal alterou, também, o endométrio de ratas adultas.

O endométrio tem comportamento complexo, com modificações cíclicas, em resposta aos padrões cíclicos de estrogênio e de progesterona oriundos do ovário, bem como aos fatores de crescimento que participam do controle autócrino e parácrino (SPEROFF & FRITZ, 2005).

Em ratas, o epitélio endometrial de revestimento sofre transformações tênues após a pinealectomia ou sob estímulo luminoso contínuo. Contudo, o glandular sofre as maiores modificações, com hipertrofia, hiperplasia e áreas de metaplasia (epitélio estratificado pavimentoso não queratinizado), apresentando redução acentuada da apoptose (DAIR, 2001; LANG, 2001). O estroma endometrial nesses animais apresenta-se muito desenvolvido e aumentado, com grande número de eosinófilos (DAIR, 2001). Em geral, o número de eosinófilos relaciona-se com maior estímulo estrínico; assim na fase de estro (após o pico estrogênico) há maior quantidade destes leucócitos. Em animal com sistema reprodutor imaturo ou nas fases de diestro ocorre o menor número de eosinófilos (BJERSING & BORGLIN, 1964).

PRATA LIMA (1998) desenvolveu um modelo de policistose ovariana em ratas após reduzir a concentração sérica de melatonina pela pinealectomia ou exposição à luz contínua. Neste estudo observou-se que as características histológicas ovarianas eram muito similares às mulheres com SOP: aumento do volume das gônadas, presença de inúmeros micropolicistos na periferia ovariana e hiperplasia estromal. Verificou-se, ainda, que a ministração de melatonina reduziu o número total, a área, o perímetro e o diâmetro dos cistos ovarianos formados, restaurando a ciclicidade estral.

Estudo realizado por SOARES Jr. et al. (2003a), registrou maior concentração de células intersticiais no ovário dos animais pinealectomizados, nas quais, detectaram-se maior concentração de organelas (mitocôndrias e retículo

endoplasmático rugoso) e gotículas lipídicas. Observou-se ainda que o volume dos núcleos das células intersticiais era maior nos ovários dessas ratas. Essas características sugerem aumento da atividade metabólica e, conseqüente elevação da produção hormonal. Entretanto, a produção de progesterona mostrava-se deficiente. Tal fato denota haver distúrbio na ovulação e redução da fertilidade, bem como insuficiência da produção hormonal pelo corpo lúteo. Essa última alteração também foi observada em estudo de TEIXEIRA et al. (2004).

Em cultura de células da granulosa, a melatonina estimula a produção de progesterona em murinos (FISKE et al., 1984), bovinos (WEBLEY & LUCK, 1986), humanos (WEBLEY et al., 1988, BRZEZINSKI et al., 1991, 1992) e ovinos (BARATTA & TAMANINI, 1992). Todavia, não se evidenciou alteração na produção estrogênica em cultura de células da granulosa de humanos, bovinos (WEBLEY & LUCK, 1986) e ovinos (BARATTA & TAMANINI, 1992).

A melatonina inibe, em cultura de células, a ação da ocitocina e vasopressina, reduzindo o AMP cíclico, o qual é o segundo mensageiro de vários receptores de membrana (SIROTKIN, 1994). Especialmente em células da granulosa humana, estimularia a produção de ocitocina e de fator de crescimento insulinóide tipo-I (IGF-I), elementos importantes na fisiologia folicular (SCHAEFFER & SIROTKIN, 1995, 1997). Portanto, a melatonina, por esse mecanismo, poderia interferir na produção hormonal nas células da granulosa.

Em ratas e no ser humano há evidências da ação direta da melatonina sobre a função ovariana: modulação da esteroidogênese ovariana, principalmente de progesterona; presença de altas concentrações deste hormônio no fluido do folículo pré-ovulatório e de receptores de melatonina do tipo I (MT1) e do tipo II (MT2) nos folículos ovarianos (WOO et al., 2001; MASANA et al., 2005).

A síndrome dos ovários policísticos (SOP) representa desordem reprodutiva complexa que acomete de 5 a 10% das mulheres. No período reprodutivo, essa condição heterogênea reflete várias etiologias potenciais e amplo espectro de apresentações clínicas. Caracteriza-se pela anovulação crônica associada ao hiperandrogenismo (DAHLGREN et al., 1998).

A importância de se conhecer a SOP também decorre das implicações a longo prazo na saúde das mulheres. Causa, além de irregularidade menstrual, infertilidade. Por estar associada à obesidade, as mulheres apresentam risco elevado de desenvolverem doenças cardiovasculares. Além disso, interfere no metabolismo ósseo, com maior propensão a osteopenia na pós-menopausa, e maior risco de apresentarem câncer de endométrio (TAN et al., 2001).

Apesar da sua etiologia ainda ser controversa, vários estudos apontam para a associação desta síndrome com distúrbios metabólicos, sobretudo com hiperinsulinemia e resistência insulínica (SPEROFF & FRITZ, 2005). Em virtude do distúrbio no metabolismo da insulina, há alterações na síntese dos fatores de crescimento insulinóides e aumento das frações livres, principalmente de IGF-I e IGF-II (SPEROFF & FRITZ, 2005). Alguns autores correlacionam essas alterações com o estado hiperandrogênico, com as anomalias na ovulação e com o abortamento de repetição em mulheres com SOP (PREMOLI et al., 2005).

O aprimoramento dos modelos experimentais que possam simular o estado de policistose ovariana, inclusive promovendo alteração dos fatores insulinóides de crescimento, seria importante para melhor compreensão da anovulação crônica, bem como para o melhor desenvolvimento de novas terapias. Há indícios ainda que a melatonina influencie na ação do hormônio de crescimento e dos fatores insulinóides (OSTROWSKA et al., 2001a). Além disso, atuaria diretamente no ovário,

especificamente no desenvolvimento folicular (presença de altas concentrações no líquido folicular) (BRZEZINSKI et al., 1987; RONNBERG et al., 1990) e na sua produção hormonal (FISKE et al., 1984).

A seleção folicular está associada a maior sensibilidade das células da granulosa aos efeitos estimulatórios do FSH e de fatores reguladores intra-foliculares. Dentre eles, destaca-se o fator de crescimento insulinóide tipo-I (IGF-I), o qual eleva a sensibilidade das células da granulosa ao FSH (ERICKSON et al., 1989; MOURA, 1995). Alguns autores sugerem que o IGF-I participaria na seleção e no desenvolvimento folicular. Contudo, esse mecanismo não está ainda bem esclarecido. Além disso, o IGF-I e o IGF-II atuam sinergicamente com o LH na produção androgênica pelas células da teca interna e intersticiais (SPEROFF & FRITZ, 2005). Sabe-se que a melatonina diminui o receptor do LH em ovários de ratas (TRENTINI et al., 1992).

Alguns estudos mostraram que, em mulheres com resistência insulínica uma das explicações para o aumento do microambiente androgênico ovariano seria a ação da insulina no receptor dos fatores insulínicos, bem como pela maior fração livre desses fatores, estimulando ainda mais esteroidogênese (WU et al., 2001). Em ratas, o IGF-I, produzido no fígado e nas células da granulosa, exerce sinergismo com o FSH na esteroidogênese das células da granulosa e ação conjunta com o LH nas células da teca interna (CALAGERO et al., 2002).

A melatonina provoca mudanças na atividade funcional da paratireóide, tireóide e córtex da supra-renal, bem como elevação da concentração sérica do IGF-I (MESS, 1983; KNIAZEWSKI et al., 1990a, b; ZWIRSKA-KORCZALA et al., 1991; WEIDENFELD et al., 1993; VAUGHAN et al., 1994). No sistema osteo-articular de ratos, a administração de melatonina inibe o metabolismo ósseo e interfere com o

controle endócrino, elevando os níveis séricos de IGF-I. Por outro lado, a redução dos níveis séricos de melatonina pela pinealectomia acarreta diminuição na produção de IGF-I (OSTROWSKA et al., 2001b).

Em hamsters fêmeas, experimentos sugerem haver interação entre os esteróides gonadais, a pineal e os níveis séricos de IGF-I. Nesses animais, observou-se que curtos períodos de exposição luminosa (menor exposição à claridade) induziram a significativa depressão nas concentrações de IGF-I, enquanto a pinealectomia parcialmente preveniu essa redução (VAUGHAN et al., 1994). Contudo, estes animais são sazonais. Portanto, os efeitos da melatonina sobre o IGF-I e suas repercussões no sistema reprodutor ainda não são totalmente conhecidos em animais não sazonais, como o ser humano e os murinos (OSTROWSKA et al. 2001b).

Em virtude da pouca informação disponível na literatura sobre a fisiologia hormonal frente a alterações nos níveis de melatonina, como também a existência de dados ainda contraditórios em alusão ao papel da melatonina no sistema reprodutor, em especial no endométrio e nos ovários, propusemo-nos a realizar o presente estudo.

2 - PROPOSIÇÃO

2.1 - Objetivo geral

Avaliar os efeitos da melatonina no sistema reprodutor de ratas adultas submetidas à pinealectomia ou expostas à luz contínua.

2.1.1 - Objetivos específicos

- a) Avaliar as concentrações urinárias de 6-sulfatoximelatonina e séricas de IGF-I e dos esteróides sexuais (estradiol, progesterona e testosterona total);
- b) Avaliar a histomorfologia e histomorfometria dos ovários;
- c) Avaliar a histomorfologia e histomorfometria do útero.

3- MATERIAL E MÉTODOS

3.1 - Material

Este estudo foi realizado na Disciplina de Endocrinologia Ginecológica do Departamento de Ginecologia da Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina (UNIFESP – EPM) em conjunto com a Disciplina de Fisiologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM). O protocolo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da UNIFESP-EPM (Projeto 1261/01).

Foram utilizadas ratas albinas (*Rattus norvegicus albinus*), adultas (três meses), virgens, pesando aproximadamente 250g, da linhagem EPM - 1 Wistar, procedentes do Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais para Medicina e Biologia (CEDEME) da UNIFESP – EPM. Posteriormente, os animais foram transportados para o Biotério da Disciplina de Fisiologia da Faculdade de Medicina da UFTM.

Os animais foram mantidos em gaiolas plásticas (máximo de cinco animais por gaiola) com grade de metal e alimentados com ração padrão (Labina-Purina) e água “*ad libitum*”, com iluminação artificial produzida por lâmpada fluorescente da marca *Phillips* (modelo luz do dia de 40 W), sendo o fotoperíodo de 10 horas claro e 14 horas escuro, considerando o período de luz das 7 às 17 horas (PERTSOV, 2006). De acordo com as recomendações do *Institute of Laboratory Animal Resources*, manteve-se a temperatura ao redor de 22°C, umidade relativa de 40 a 70 % e nível de barulho mínimo (ASDEL, 1964).

3.2 – Métodos

3.2.1 - Exame colpocitológico

Após período de duas semanas para adaptação ao novo ambiente, esfregaços vaginais (colpocitologia) foram colhidos diariamente, durante 21 dias consecutivos, para monitorizar a periodicidade do ciclo estral. Os esfregaços foram distribuídos em lâminas de vidro, fixados em solução de álcool-éter (1:1), sendo então submetidos à coloração Harris-Shorr. Somente foram incluídas no experimento as ratas que tiveram pelo menos três ciclos estrais seguidos de quatro dias.

O conteúdo vaginal foi obtido por meio de finas escovas (*cito brush*), cuidadosamente introduzidas na vagina. Foram realizadas manobras rotativas para a coleta de células. O material para análise citológica foi distribuído em lâmina de vidro e imediatamente processado. O exame colpocitológico foi avaliado à microscopia de luz, com aumento de 40 vezes.

As quatro fases do ciclo estral (estro, proestro, metaestro e diestro) foram identificadas pela distinção dos elementos contidos nos esfregaços: presença de leucócitos, muco e a relação entre as células eosinófilas e basófilas.

As ratas que apresentaram ciclos estrais regulares (n=130) foram divididas, aleatoriamente, em seis grupos, a saber: GI – controle, tratado com veículo (n=22); GII – falsamente pinealectomizado (*sham*), tratado com veículo (n=20); GIII – pinealectomizado, tratado com veículo (n=20); GIV – pinealectomizado, tratado com melatonina (n=24); GV – submetido à luz contínua, tratado com veículo (n= 20); GVI – submetido à luz contínua, tratado com melatonina (n=24).

3.2.2 - Pinealectomia

A pinealectomia foi realizada em animais previamente anestesiados com pentobarbital sódico (Hypnol®, laboratório Cristália), na dosagem de 60 mg/Kg, por via intraperitoneal. Após 3 a 5 minutos, procedeu-se à tricotomia da porção dorsal da cabeça e, em seguida, os animais foram colocados em aparelho esterotático.

Na linha médio-dorsal da cabeça, após assepsia e tricotomia da porção superior da cabeça, fez-se incisão desde a região inter-auricular até pouco antes da região inter-orbitária. Em seguida, afastou-se a pele e o periósteo, expondo-se assim o osso da calota craniana. Com o auxílio de um micromotor de baixa rotação (marca NSR, 20.000 RPM, 50/60 Hz) e de broca circular de dentista nº 5, a calota craniana foi aberta em uma extensão de aproximadamente 5 mm de diâmetro, tendo como ponto central o lâmbda. A seguir, visualizando-se a confluência do seio venoso sagital superior e do transversal (em forma de Y), executou-se incisão da dura-máter.

Em seqüência, retirou-se a glândula pineal com o auxílio de uma pinça delicada, tomando-se sempre o cuidado de evitar lesão dos seios venosos. A glândula foi imediatamente mergulhada em formol 10%, para posterior análise histológica ao microscópio de luz. A hemostasia foi praticada por tamponamento. A seguir, recobriu-se o crânio com fragmento ósseo e cera de osso, e suturou-se a pele com nylon 4-0 (WHITE et al., 1997). O mesmo procedimento foi realizado nos animais do Grupo falsamente pinealectomizado (*sham*), porém, nesses não se removeu a glândula pineal.

Após pinealectomia, três ratas faleceram (GIII). O exame de necropsia mostrou extensa área de hemorragia intracraniana nestes animais, provocando alteração do número inicial de animais. Excluíram-se, também, as ratas que morreram ao longo do experimento: duas no Grupo controle (GI); três no que foi pinealectomizado e recebeu melatonina (GIV) e quatro no Grupo sob luz contínua que recebeu melatonina (GVI).

Para que não houvesse comprometimento do resultado final, realizou-se a reposição das ratas nos grupos, a fim de que ao final do experimento os grupos tivessem 20 animais.

3.2.3 - Coleta urinária

Cada animal, na noite anterior à coleta de sangue e à retirada do útero e ovário, em fase de proestro, foi colocado em gaiola metabólica para a coleta noturna da urina (17h às 7h do dia seguinte). Posteriormente, o volume urinário foi registrado e cada amostra centrifugada a 4.000x g por 10 min. O resultado do sobrenadante foi congelado e estocado a -20°C .

3.2.4 - Estímulo luminoso

O estímulo luminoso contínuo foi obtido utilizando-se caixa de madeira, bem dimensionada e ventilada, contendo lâmpadas (Phillips, modelo luz dia, 40 W), as quais forneceram cerca de 400 Lux na região ocupada pelos animais (TAKEO et al., 1986). Estas lâmpadas permaneceram acesas durante todo o experimento. A caixa foi mantida dentro do biotério da Universidade Federal do Triângulo Mineiro com controle adequado de temperatura.

3.2.5 - Reposição com melatonina

A melatonina foi obtida por importação (Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA) e ministrada na água de beber, na dose de 10 μg /noite por animal (0,4 μg /ml), em frascos

âmbar, das 17h às 7h (TEIXEIRA et al., 2004). Durante o dia foi feita restrição à água (TRENTINI et al., 1992). A solução de melatonina foi preparada diariamente, dissolvendo-se 400 mg de melatonina cristalina em 1 ml de álcool absoluto; esta solução foi diluída, a seguir, em 1 litro de água. O tratamento com melatonina foi iniciado no 5.º dia após a pinealectomia para o Grupo IV e, para o Grupo GVI iniciada juntamente com o início do estímulo luminoso. O tratamento com melatonina nesses grupos foi realizado durante 90 dias consecutivos. A mesma quantidade de solução de álcool absoluto foi ministrada na água dos demais grupos (GI, GII, GIII e GV).

3.2.6 - Coleta de sangue

Na manhã do dia final do experimento (às 7h), todos os animais, na fase de proestro, foram anestesiados por via intraperitoneal com ketamina[®] e ketalar[®] (0,1 mg/kg). Inicialmente, amostras de sangue foram coletadas por pipeta Pasteur introduzidas no plexo ocular das ratas. Em seguida, fez-se a abertura da cavidade abdominopélvica, retirando-se os cornos uterinos e os ovários. Após a centrifugação do sangue, o plasma obtido foi armazenado a – 80°C na Disciplina de Imunologia da Universidade Federal do Triângulo Mineiro e depois transportado para o Laboratório de Análises Clínicas do Departamento de Psicobiologia da UNIFESP (AFIP) em gelo seco, sempre mantendo temperatura adequada.

3.2.7 - Controle da pinealectomia após término do estudo

As ratas pinealectomizadas, após a coleta da urina, sangue e exérese do útero e dos ovários, foram submetidas à perfusão com introdução de uma cânula

através da punção no ventrículo esquerdo e, a seguir, fez-se abertura no átrio direito após o clampeamento da aorta abdominal. A perfusão foi conduzida com ajuda de bomba de infusão e procedeu-se da seguinte maneira: introdução de solução tampão Millionigs 0,12 M, pH 7,4 (50ml); ministração de solução de sulfeto de sódio a 0,1%, pH 7,4 (100 ml durante cinco minutos), solução de glutaraldeído a 3%, pH 7,4 (100 ml durante dez minutos) e, por último, solução de sulfeto de sódio a 0,1%, pH 7,4 (200 ml durante 30 minutos).

Após a perfusão, o crânio foi então aberto para confirmação dos procedimentos cirúrgicos previamente executados (presença ou ausência da glândula pineal). Em seguida, o encéfalo foi retirado e colocado em solução de sulfeto de sódio a 0,1% em tampão Millionigs durante seis horas, logo depois transferido para solução de glutaraldeído a 3% durante 36 horas. Posteriormente, colocou-se em solução de sacarose a 30% por 1-2 dias a 4°C, até o tecido descer. A região entre a comissura posterior e a habênula foi cortada em fatias finas (30 a 45 µm por método de criocortes a baixa temperatura), as quais foram mantidas em solução fosfato tamponada (pH = 7,5) até serem preparadas para a coloração pelo cresil violeta. Os animais que apresentaram lesão nessas regiões foram excluídos: dois do Grupo III e um do Grupo IV.

3.2.8 - Determinação dos níveis hormonais circulantes

No soro, foram realizadas as dosagens hormonais do fator de crescimento insulinóide do tipo I (IGF-I), estradiol, progesterona e testosterona total. Todas foram realizadas em duplicata e supervisionadas pela Dra. Magna Bignotto, do Departamento de Psicobiologia da UNIFESP-EPM.

As concentrações de IGF-I foram dosadas no soro pela técnica imunorradiométrica (IRMA) de duplo anticorpo, com extração prévia mediante utilização de *Kit* DSL (Diagnostic Systems Laboratories)-2900. O processo seguiu os princípios básicos do radioimunoensaio onde há competição entre um antígeno radioativo e outro não-radioativo. O DSL-2900 mouse/rat IGF-I RIA inclui, como primeiro passo, a simples extração pela técnica do ácido clorídrico-etanol modificado, na qual o IGF-I é separado de sua proteína carreadora, sendo essa etapa essencial para a sua determinação. O primeiro anticorpo estará imobilizado na parede dos tubos sendo o segundo, radioativo, o que possibilita a sua detecção. Os resultados foram expressos em ng/ml.

As dosagens de estradiol (ACS -180, Bayer, com limite de detecção de 10 pg/ml), progesterona (ACS -180, Bayer com limite de detecção 0,1 ng/ml) e testosterona (ACS -180, Bayer com limite de detecção de 0,15 ng/ml) foram efetuadas pelo método de quimioluminescência, com máquina Centaur (Bayer). A porcentagem máxima de reatividade cruzada para outros esteróides nas determinações de estradiol, progesterona e testosterona total foi menor que 0,01% (especificidade).

3.2.9 - Determinação da 6-sulfatoximelatonina (6SMT) urinária

A determinação do metabólito da melatonina na amostra foi realizada por radioimunoensaio para 6-sulfatoximelatonina (WHB, Bromma, Sweden) e expresso em ng/ml com limite de detecção de 0,01 ng/ml.

3.2.10 - Microscopia de Luz

Após a abertura da cavidade abdominal desde o púbis até o rebordo das costelas, para facilitar a remoção total dos ovários e cornos uterinos, esses foram mergulhados em líquido de Bouin por 48 horas. Ao final desse período, as amostras foram submetidas à rotina histológica com desidratação em álcool etílico (concentrações crescentes), diafanização pelo xilol, seguido de impregnação e inclusão em “*paraplast*”. Posteriormente, os blocos foram cortados em micrótomo do tipo Minot (Leica RM 2035) e ajustado para 5 µm. Os cortes assim obtidos foram colocados em lâminas previamente untadas com albumina de Mayer e mantidos em estufa regulada à temperatura de 37 °C, durante 24 horas, para secagem e colagem. Em seqüência, foram submetidos à técnica de coloração pela hematoxilina-eosina (H.E.), analisados em microscópio de luz (10x a 300x), da marca OLYMPUS BX-49, e fotografados em microscópio OLYMPUS BX-50. Os mesmos cortes foram usados para a análise histomorfométrica.

3.2.11 - Análise histomorfométrica

A histomorfometria foi processada em sistema de captura de imagens, as quais foram analisadas pelo programa AxionVision (Zeiss) na Disciplina de Histologia e Biologia Estrutural do Departamento de Ginecologia da UNIFESP- EPM. Este processo consiste de um microscópio de luz (Axiolab Standart 20, Zeiss), acoplado a vídeo-câmera de alta resolução (AxionCam - Zeiss), a qual transmite imagem ao computador.

Para cada animal, foram feitas 10 leituras por lâmina. O útero foi separado em quatro quadrantes para facilitar a orientação das medidas. Ambos os ovários foram incluídos, sendo realizados cortes da região central para a periférica. Consideramos o valor da média final de cinco cortes consecutivos em cada animal para a leitura dos resultados dos dois ovários. As estruturas de interesse foram medidas em μm .

Foram analisados os seguintes itens no ovário: 1 – espessura do epitélio de revestimento; 2 – número de mitose no epitélio de revestimento; 3 – número de mitose nos folículos secundários; 4 – número de células intersticiais.

No útero, foram avaliados os seguintes parâmetros: 1 – espessura do epitélio endometrial; 2 – espessura do endométrio; 3 – números de eosinófilos (próximo ao miométrio); 4 – espessura miometrial.

3.3 - Análise Estatística

Após a coleta dos dados, foram calculados a média, a mediana e o desvio-padrão da média. Em seguida, a homogeneidade da amostra foi avaliada pelo teste de Barlett. Conforme a distribuição de normalidade em cada grupo e variável empregou-se o teste de análise de variância ANOVA ou o teste Kruskal-Wallis, seguido pelo teste *post-hoc de* Bonferroni. Em todos os testes, fixou-se em 0,05 ou 5% ($\alpha \leq 0,05$), o nível de rejeição da hipótese de nulidade e os resultados foram apresentados como média \pm erro padrão da média (SEM). As análises foram efetuadas empregando-se o programa de computador SigmaStat 2.03 (SSI, Point Richmond, CA).

4- RESULTADOS

4.1 - Determinação de níveis dos hormônios séricos e urinários

Os dados das dosagens de 6-sulfatoximelatonina (6SMT), fator de crescimento insulinóide tipo I (IGF-I), estradiol, progesterona e testosterona total estão expressos na Tabela 1 e nas Figuras 1 a 5.

Os níveis de 6SMT foram menores nos grupos pinealectomizados (GIII) e submetidos à luz contínua (GV) que não foram tratados com melatonina do que nos outros grupos (GI, GII, GiV e GVI).

Em relação ao IGF-I, os níveis séricos foram menores nos animais dos grupos III, V e VI. Nota-se que o tratamento com melatonina no GIV não determinou aumento das taxas de IGF-I em comparação aos controles. Contudo, houve diminuição do nível de estradiol e de testosterona total após a ministração de melatonina, visto que os níveis séricos desses hormônios foram menores nos Grupos IV e VI quando comparados, respectivamente, aos Grupos III e V. Os valores nesses últimos dois grupos foram significativamente maiores do que nos Grupos controles (GI e GII). Os níveis séricos de progesterona foram significativamente menores nos Grupos III e V em relação aos outros grupos.

Tabela 1 – Médias e erros-padrão das determinações urinária de 6 Sulfatoximelatonina (6-SMT) e dos níveis séricos de IGF-1, estradiol, progesterona e testosterona total nos grupos estudados

Grupos	6-SMT	IGF-1	Estradiol	Progesterona	Testosterona
GI*	25,3 ± 3,1	413,8 ± 14,6	73,2 ± 6,5	16,3 ± 2,0	90,6 ± 4,9
GII*	27,2 ± 3,4	424,8 ± 36,1	81,7 ± 8,9	15,8 ± 2,5	89,9 ± 4,3
GIII*	3,2 ± 1,1 ^a	194,7 ± 19,1 ^b	109,7 ± 8,4 ^c	6,1 ± 1,5 ^d	96,3 ± 3,8
GIV*	36,8 ± 3,8	442,4 ± 22,4	84,3 ± 8,2	11,1 ± 0,8	80,8 ± 5,3 ^f
GV*	0,6 ± 0,1 ^a	216,2 ± 33,9 ^b	124,9 ± 4,2 ^c	5,2 ± 1,5 ^d	96,9 ± 4,6
GVI*	30,5 ± 5,9	274,8 ± 23,8 ^b	97,3 ± 6,9	8,4 ± 1,9 ^e	73,6 ± 3,9 ^f

a, b, c - p<0,01 comparado com os outros Grupos

d – p<0,01 comparado aos Grupos I, II e IV

e – p <0,05 comparado aos Grupos I, II, III e V

f – p <0,05 comparado aos Grupos III e V

* GI – controle

GII – *sham*

GIII – pinealectomia

GIV – pinealectomia + melatonina

GV – luz

GVI – luz + melatonina

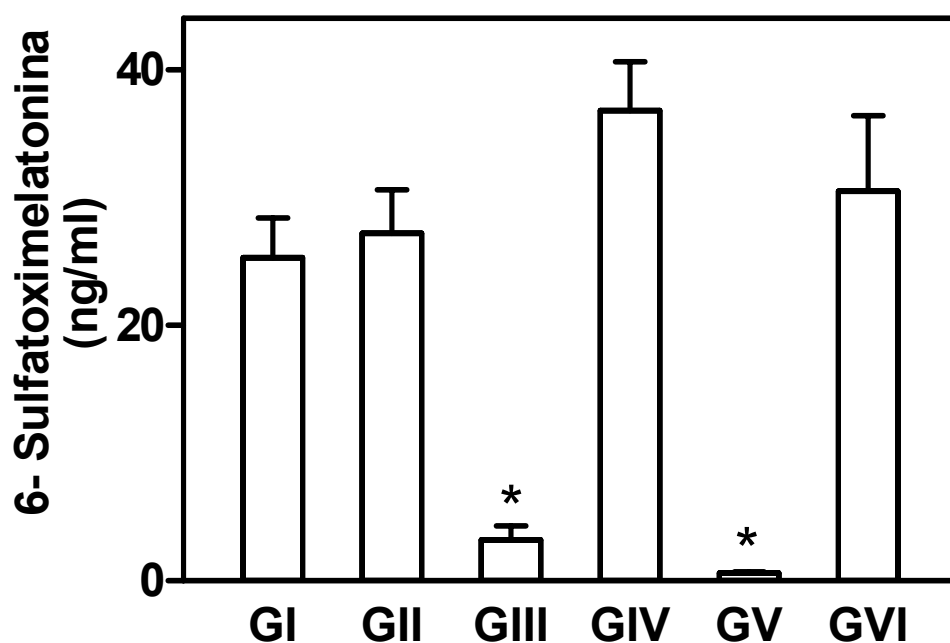


Fig.1 – Determinação urinária de 6-Sulfatoximelatonina (6-SMT) por radioimunoensaio.

* $p < 0,01$ comparado aos Grupos I, II, IV, e VI

** GI – controle

GII – *sham*

GIII – pinealectomia

GIV – pinealectomia + melatonina

GV – luz

GVI – luz + melatonina

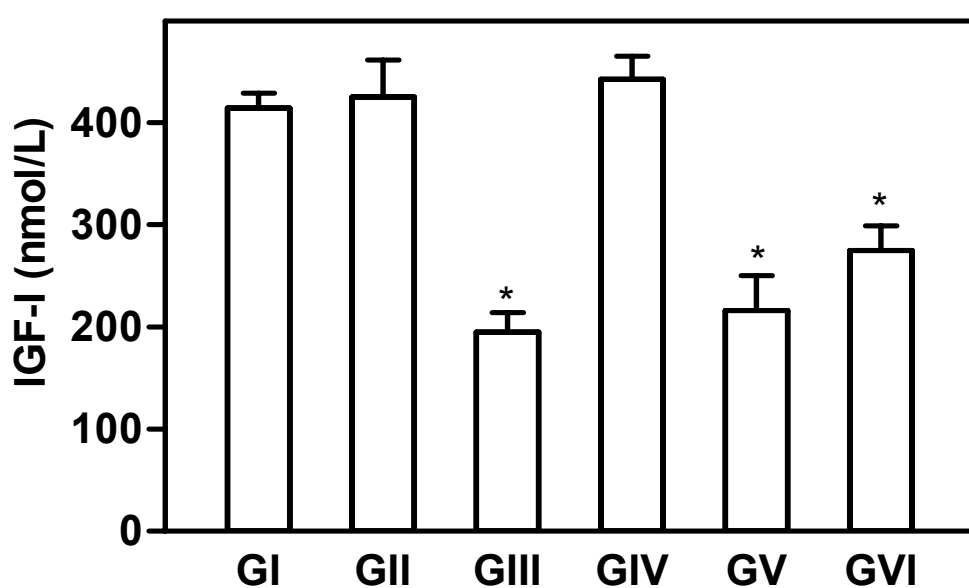


Fig. 2 – Determinação sérica de IGF-I por técnica imunorradiométrica.

* $p < 0,01$ comparado aos Grupos I, II e IV

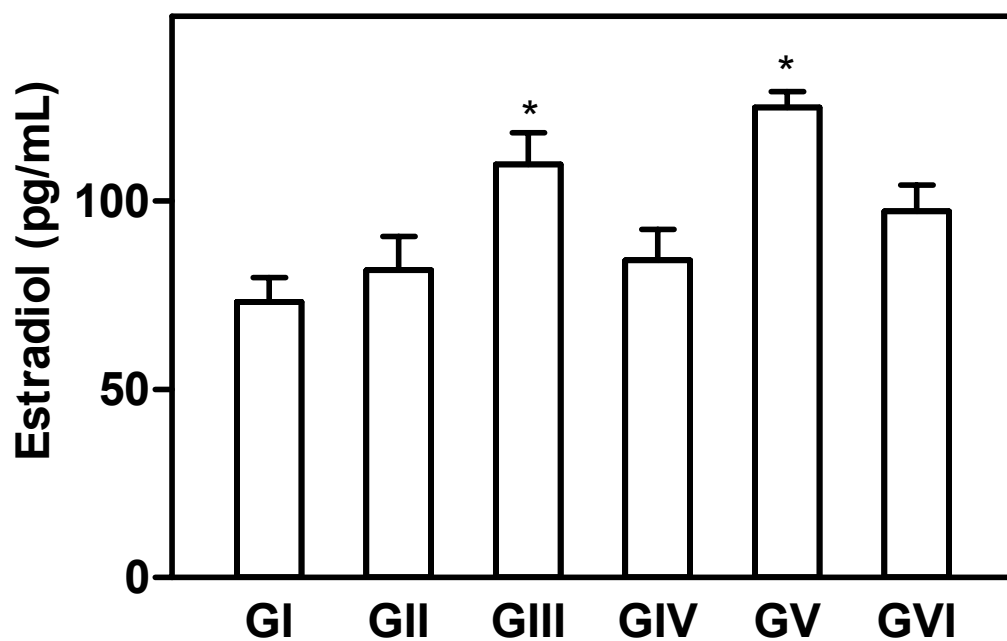


Fig. 3 – Determinação sérica de estradiol por técnica de quimioluminescência.
* $p < 0,01$ comparado aos Grupos I, II, IV, e VI

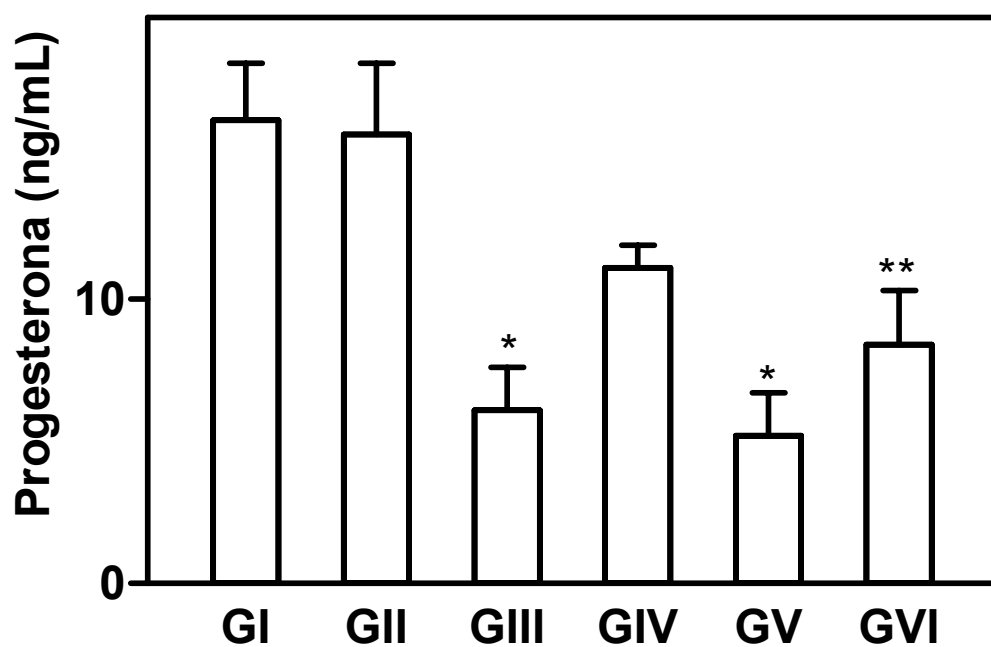


Fig. 4 – Determinação sérica de progesterona por técnica de quimioluminescência.
* $p < 0,01$ comparado aos Grupos I, II e IV
** $p < 0,05$ comparado aos Grupos I, II, III e V

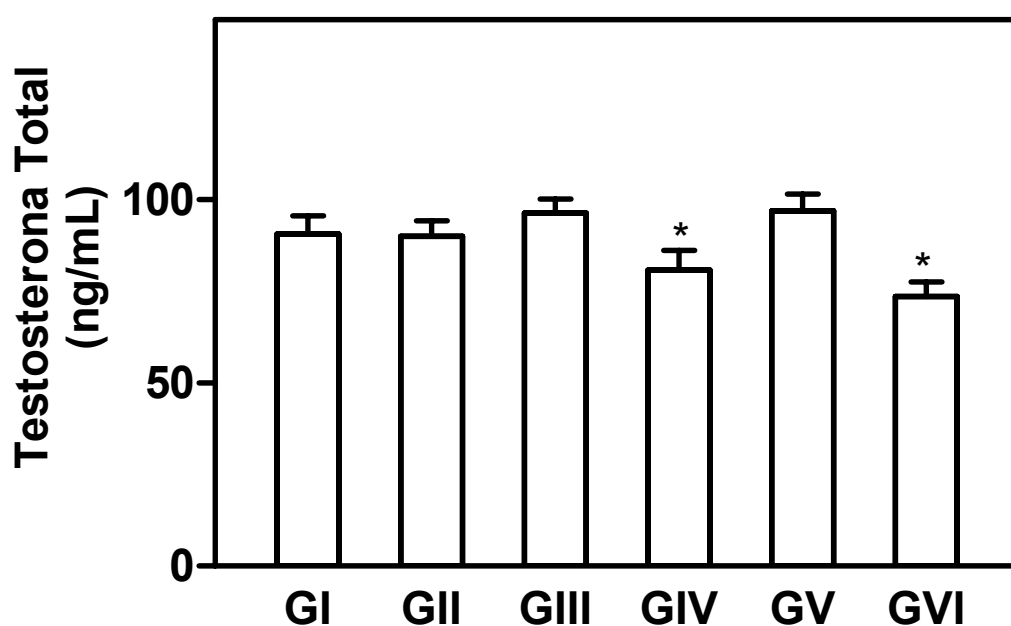


Fig. 5 – Determinação sérica de testosterona total por técnica de quimioluminescência.

* $p < 0,01$ comparado aos Grupos III e V

4.2 - Histomorfologia do ovário

4.2.1 - Epitélio de revestimento ovariano

Nos Grupos I e II (controle e *sham*), o epitélio de revestimento superficial do ovário mostrou-se do tipo cúbico simples. As células apresentavam citoplasma claro e eosinofílico, com núcleo esférico e central, onde foram identificadas raras figuras de mitose. Nos Grupos III e V, o epitélio revelou-se do tipo cilíndrico simples, contendo células com citoplasma claro e eosinofílico, com núcleos alongados e heterocromáticos. O Grupo IV apresentou aspecto histológico semelhante aos dos Grupos I e II, enquanto o Grupo VI possuía formas intermediárias entre os Grupos I, II, III e V (Fig. 6).

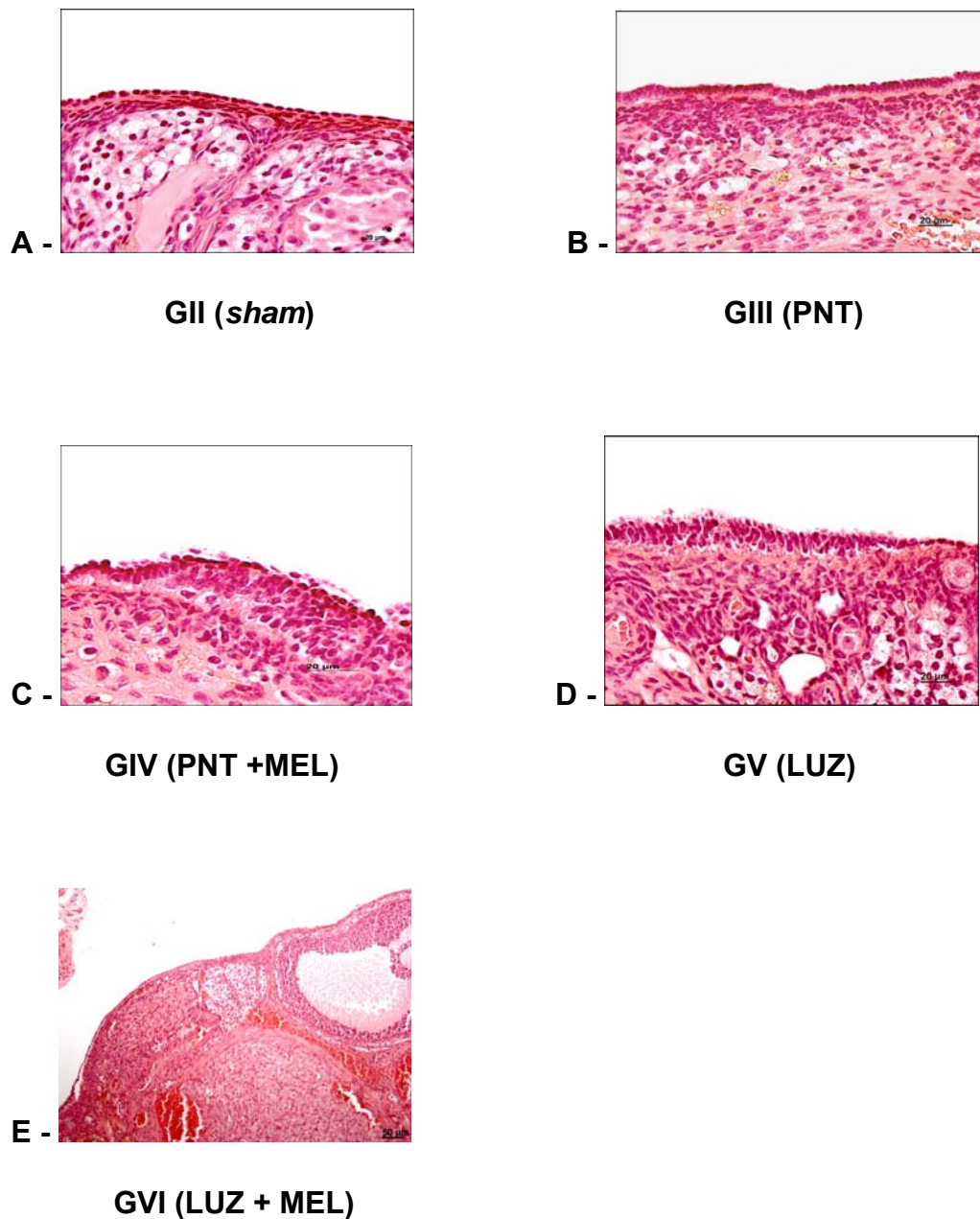


Fig. 6 – Fotomicrografia de cortes histológicos de parte do ovário de ratas adultas: A – observar epitélio de revestimento no Grupo II (*sham*); B – notar epitélio de revestimento no Grupo III discretamente mais espesso do que o Grupo II; C – epitélio de revestimento no Grupo IV semelhante aos Grupos I e II; D – epitélio de revestimento no Grupo V semelhante ao grupo III; E – epitélio de revestimento no Grupo VI apresenta características intermediárias aos Grupos I e II e aos Grupos III e V. HE.

4.2.2 - Estroma Ovariano

Nos cortes histológicos dos Grupos I e II, notou-se grande concentração de folículos ovarianos em vários estágios de desenvolvimento, desde primordiais até pré-ovulatórios. Observaram-se ainda vários corpos lúteos íntegros e outros em estágio de involução. As estruturas foliculares e os corpos lúteos ocupavam a maior parte do estroma ovariano. Havia também algumas células intersticiais com citoplasma claro e eosinofílico, contendo núcleos esféricos e centrais. Estas células localizavam-se, principalmente, em torno dos vasos sangüíneos. Nos Grupos III e V, registrou-se alteração da população folicular, com predomínio de folículos primários e secundários (folículos em crescimento), e em alguns casos, presença de cistos foliculares. Em muitos folículos secundários, observou-se proliferação da camada de células da teca interna, com várias figuras de mitose e presença de múltiplas células intersticiais próximas aos folículos. Verificaram-se, ainda, muitos cordões de células intersticiais no estroma ovariano. No Grupo IV, existiam folículos terciários (maduros) e corpos lúteos, mas notavam-se células intersticiais de permeio aos folículos. No Grupo GVI, desvelou-se a presença de vários cistos foliculares e maior concentração de células intersticiais que no Grupo IV (Fig. 7).

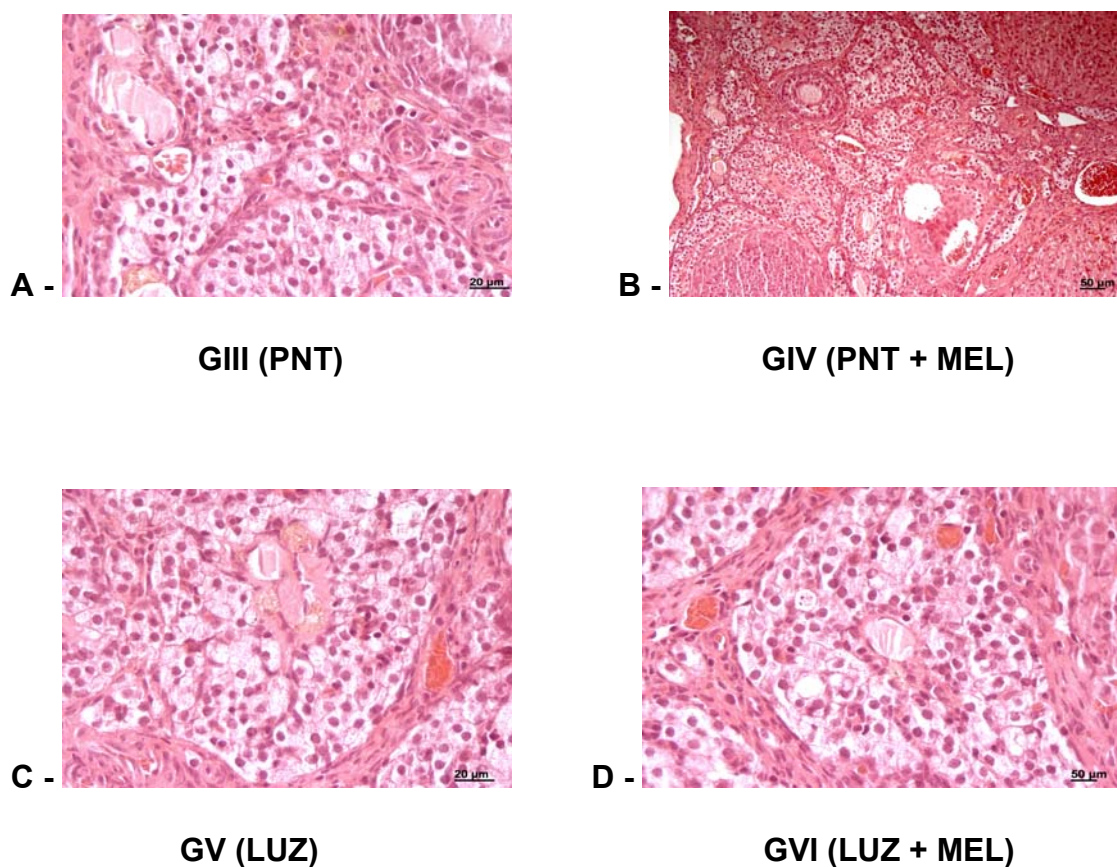


Fig. 7 – Fotomicrografia de cortes histológicos de parte dos ovários de ratas: A – observar grande quantidade de células intersticiais formando glândulas no Grupo III; B – notar que há cordões de células intersticiais no Grupo IV; C – observar grande quantidade de células intersticiais no Grupo V, semelhante ao Grupo III; D – observar grande quantidade de células intersticiais no Grupo VI, porém em menor quantidade em relação ao Grupo V. HE .

4.3 - Histomorfometria do ovário

Os dados histomorfométricos do ovário das ratas nos vários grupos estudados estão resumidos na Tabela 2 e representados nas Figuras 8 a 11. Houve aumento da espessura do epitélio de revestimento ovariano, incremento das figuras de mitose neste epitélio e nos folículos ovarianos e no número de células intersticiais nos Grupos III e V em relação aos outros grupos, com exceção ao Grupo GVI que apresentou valores elevados do número de mitoses no epitélio de revestimento.

Tabela 2 - Médias e erros-padrão dos parâmetros histomorfométricos avaliados nos ovários de ratas nos grupos estudados

	GI	GII	GIII	GIV	GV	GVI
Espessura do ERO* (x10 μ m)	5,7 \pm 0,6	6,2 \pm 0,9	10,2 \pm 0,8 ^a	7,7 \pm 2,2	16,1 \pm 1,4 ^a	11,4 \pm 4,9
Mitoses no ERO* (n)	24,5 \pm 2,3	25,9 \pm 2,1	49,1 \pm 3,2 ^b	30,5 \pm 2,9	56,4 \pm 2,1 ^b	44,2 \pm 6,1 ^c
Células intersticiais (n)	152,2 \pm 25,2	140,8 \pm 18,2	290,1 \pm 33,2 ^d	158,4 \pm 52,8	240,1 \pm 15,2 ^d	219,1 \pm 30,8
Mitose nos folículos (n) **	44,7 \pm 5,3	55,1 \pm 7,1	97,1 \pm 6,2 ^e	63,5 \pm 2,9	106,4 \pm 3,1 ^e	48,2 \pm 6,3

*ERO = epitélio de revestimento do ovário

** número de mitose em 10 folículos secundários

a – p<0,05 comparado aos Grupos I e II

b – p<0,01 comparado aos Grupos I, II, IV

c – p<0,05 comparado aos Grupos I e II

d – p<0,01 comparado aos Grupos I, II e IV

e – p<0,01 comparado aos Grupos I, II, IV e VI

♦ GI – controle

GII – *sham*

GIII – pinealectomia

GIV – pinealectomia + melatonina

GV – luz

GVI – luz + melatonina

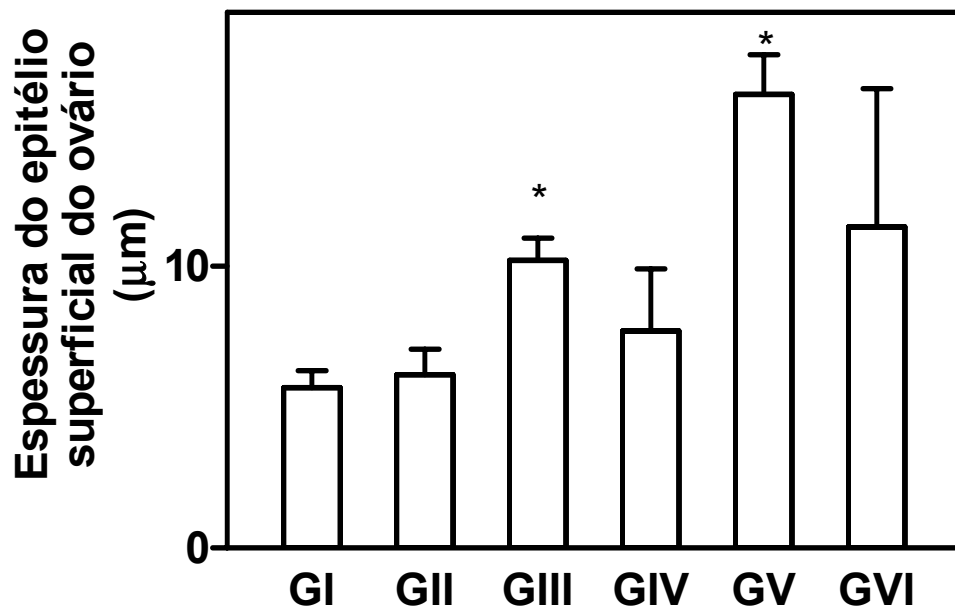


Fig. 8 – Representação gráfica da espessura do epitélio de revestimento do ovário de rata nos grupos estudados.

* $p < 0,05$ comparado aos Grupos I e II

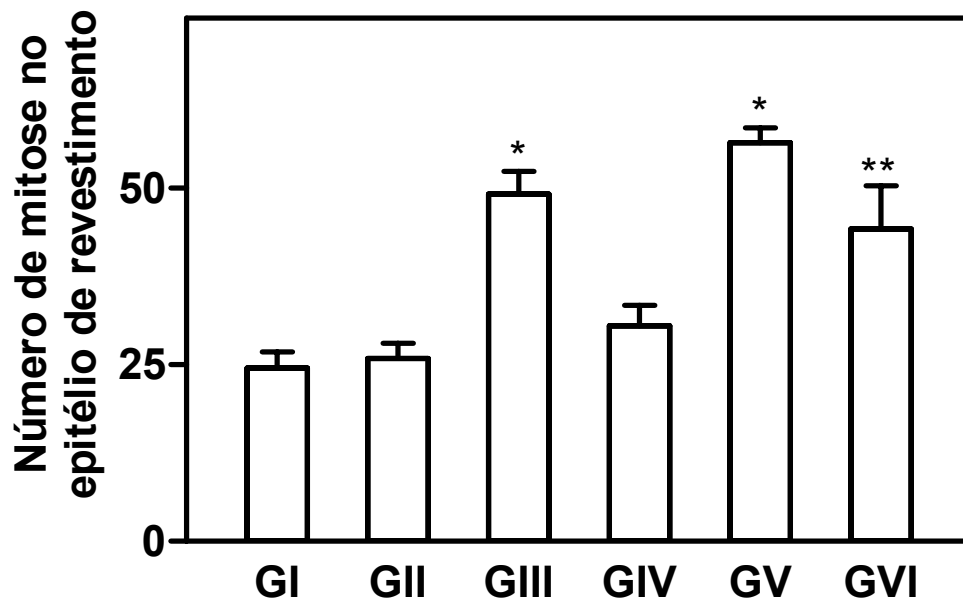


Fig. 9 – Representação gráfica do número de mitoses no epitélio de revestimento do ovário de rata nos grupos estudados.

* $p < 0,01$ comparado aos Grupos I, II, IV

** $p < 0,05$ comparado aos Grupos I e II

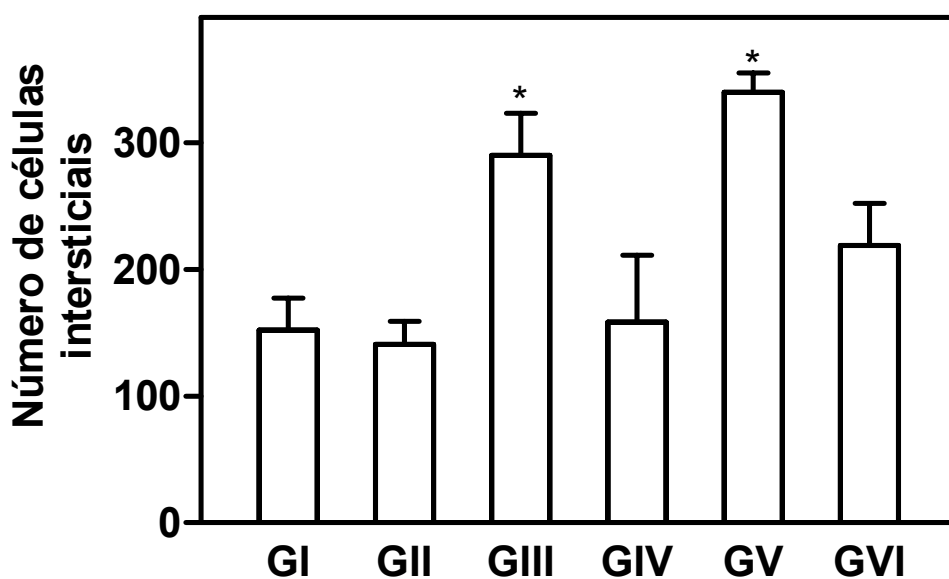


Fig. 10 – Representação gráfica do número de células intersticiais no estroma do ovário de rata nos grupos estudados.

* $p < 0,01$ comparado aos Grupos I, II e IV

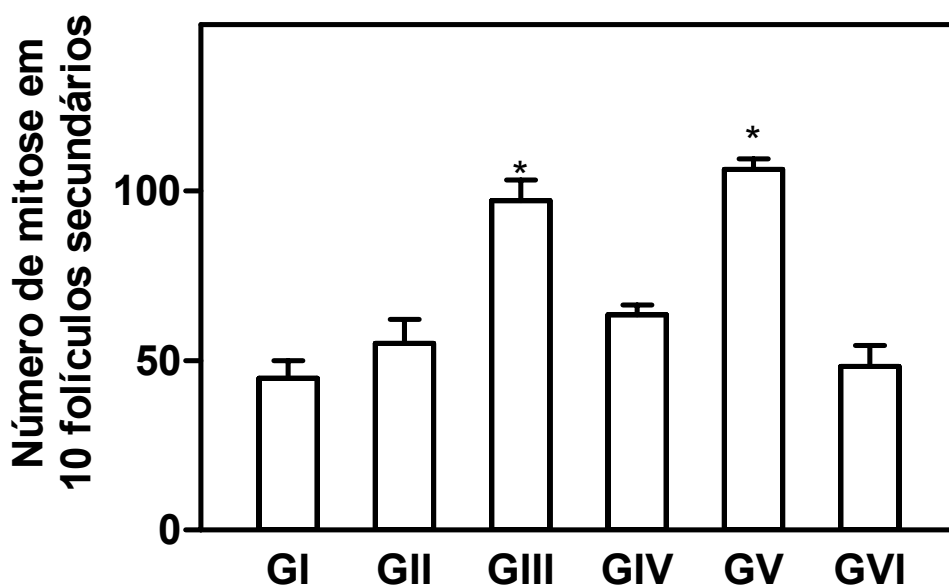


Fig. 11 – Representação gráfica do número de mitoses em 10 folículos secundários do ovário de rata nos grupos estudados.

* $p < 0,01$ comparado aos Grupos I, II, IV e VI.

4.4 - Histomorfologia do útero

4.4.1 - GI (controle, tratadas com veículo) – O endométrio mostrou-se bem desenvolvido, revestido internamente por epitélio cilíndrico simples, cujas células apresentavam núcleo elíptico, localizado no pólo basal, com um ou mais nucléolos bem evidentes. Observou-se ainda, em alguns pontos, discreta infiltração leucocitária. O estroma endometrial, por sua vez, revelava duas regiões bem distintas: uma rica em células, localizada logo abaixo do epitélio superficial, e outra, rica em fibras colágenas próxima ao miométrio. Verificou-se, também, grande quantidade de glândulas revestidas por epitélio cúbico simples. Identificaram-se, ainda, alguns leucócitos do tipo eosinófilo próximo ao miométrio (Fig. 12).

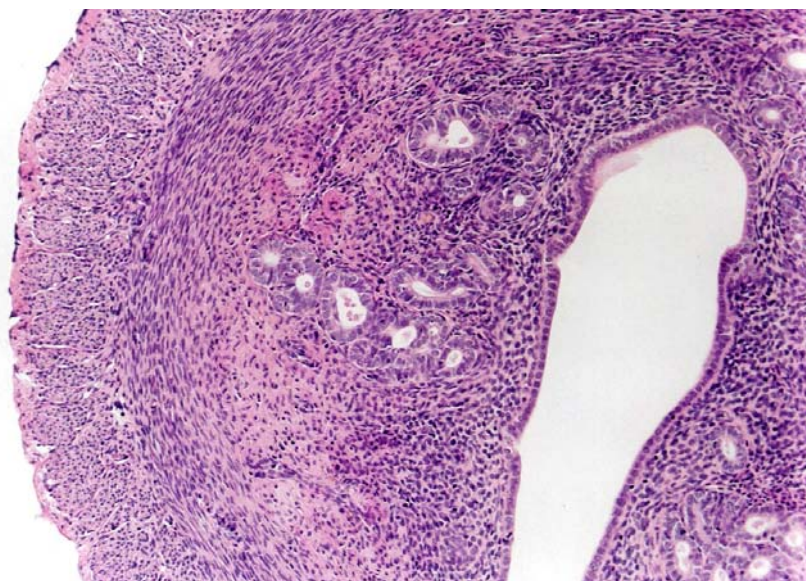


Fig. 12 – Fotomicrografia de corte histológico do útero de rata pertencente ao Grupo I (controle) durante a fase de proestro. Notar epitélio superficial do tipo cilíndrico simples. Observar infiltração leucocitária tanto no epitélio superficial quanto no estroma. HE.

4.4.2 - GII (ratas falsamente pinealectomizadas e tratadas com veículo - *sham*) - A arquitetura histológica do endométrio neste grupo achava-se muito semelhante ao Grupo I. O epitélio de revestimento era do tipo cilíndrico simples.

Observaram-se, igualmente, duas regiões bem delimitadas no estroma endometrial, uma com celularidade aumentada, situada logo abaixo do epitélio superficial, e a outra, mais profunda, com grande quantidade de fibras colágenas e presença de alguns leucócitos do tipo eosinófilo próximo ao miométrio (Fig. 13).

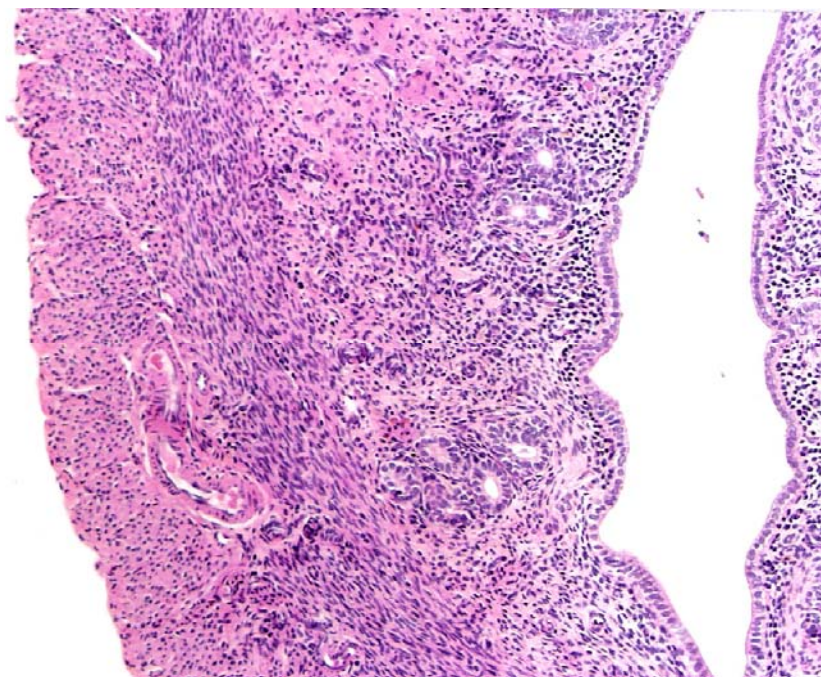


Fig. 13 - Fotomicrografia de corte histológico do útero de rata pertencente ao Grupo II (*sham*) durante a fase de proestro. Notar epitélio superficial do tipo cilíndrico simples. Observar infiltração leucocitária tanto no epitélio superficial quanto no estroma. HE.

4.4.3 - GIII (ratas pinealectomizas e tratadas com veículo) – Neste grupo o endométrio mostrou-se revestido por epitélio cilíndrico simples com células colunares altas, apresentando intenso infiltrado leucocitário. O estroma, por sua vez, revelava grande concentração de fibras colágenas, e, em alguns pontos, notava-se maior concentração de células estromais. As glândulas endometriais, em maior número, achavam-se revestidas por epitélio cúbico ou cilíndrico simples; em alguns locais o epitélio era do tipo estratificado pavimentoso não queratinizado. Observou-se ainda grande quantidade de fibroblastos típicos e eosinófilos (Fig. 14).

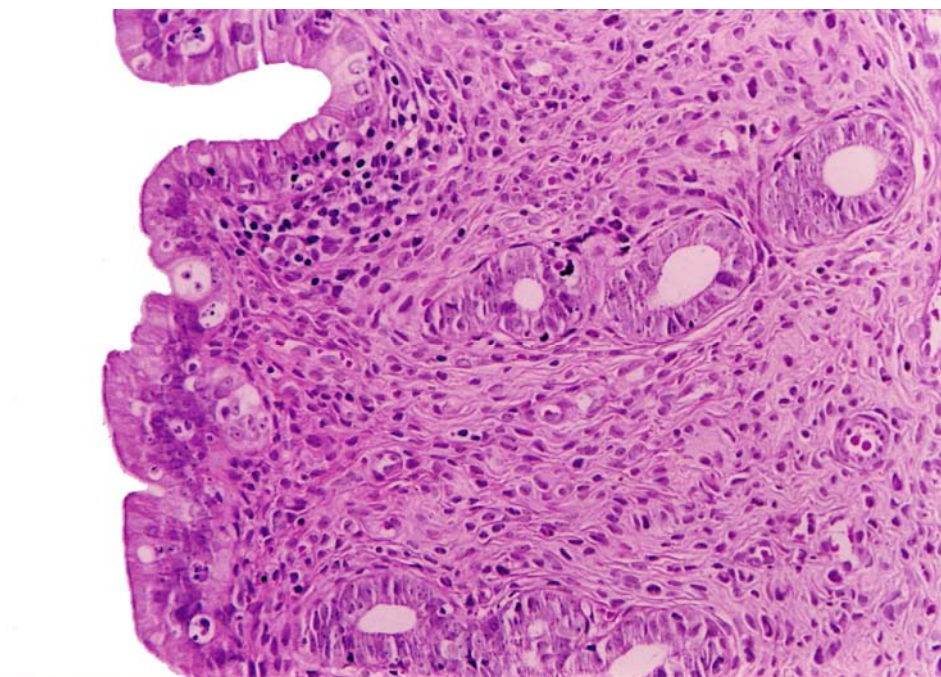


Fig. 14 - Fotomicrografia de corte histológico do útero de rata pertencente ao Grupo III (pinealectomia e tratado com veículo) durante a fase de proestro. Notar proliferação epitelial com áreas de pseudo-estratificação. O endométrio é mais desenvolvido do que nos Grupos controles (GI e GII). Há infiltração leucocitária intensa. HE.

4.4.4 - GIV (ratas pinealectomizadas e tratadas com melatonina) – O endométrio assemelhava-se, morfológicamente, aos Grupos controle (GI) e *sham* (GII). O estroma endometrial mostrava-se constituído por duas regiões bem distintas: uma mais celular e delgada, localizada logo abaixo do epitélio de revestimento, e outra mais densa, rica em fibras colágenas, a qual se estendia até o miométrio. Notou-se, também, a presença de inúmeros eosinófilos próximos ao miométrio, em quantidade menor do que no Grupo III. O endométrio apresenta-se revestido por epitélio cilíndrico simples, constituído predominantemente por células cilíndricas, com núcleos elípticos localizados na região central ou ligeiramente deslocados para a base, com um ou mais nucléolos bem evidentes. Observaram-se, ainda, figuras de mitose e infiltração leucocitária menos intensa do que no GIII. As glândulas endometriais, em pequena quantidade, estavam revestidas por epitélio cúbico simples (Fig. 15).

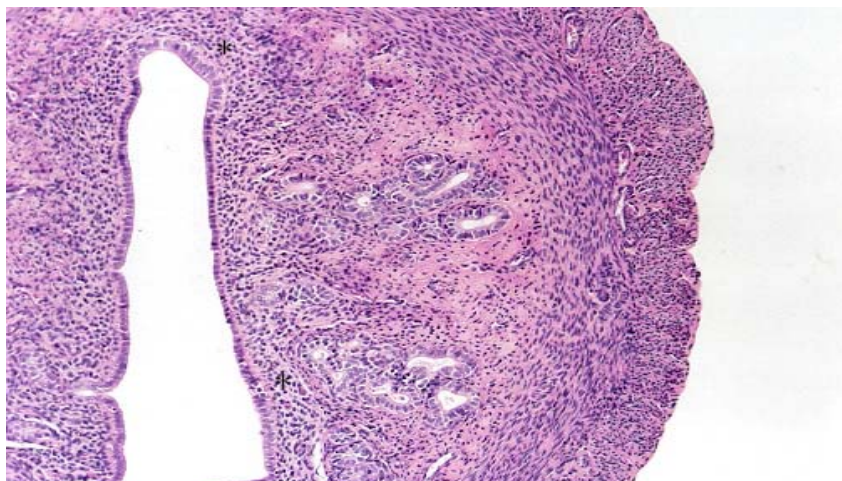


Fig. 15 - Fotomicrografia de corte histológico do útero de rata do Grupo IV (pinealectomia e tratada com melatonina) durante o proestro. Notar epitélio superficial do tipo cilíndrico simples com áreas de pseudo-estratificação (*). Observar infiltração leucocitária tanto no epitélio superficial quanto no estroma (menos intenso do que no Grupo III). HE.

4.4.5 - GV (ratas submetidas à luz contínua e tratadas com veículo) – O endométrio apresentava-se bem desenvolvido e revestido por epitélio cilíndrico simples. As glândulas endometriais eram escassas, sendo que algumas mostravam áreas de metaplasia. Na desembocadura de algumas glândulas havia um brotamento que se dirigia para a luz uterina, contendo três a quatro camadas de células. Observaram-se também leucócitos e figuras de mitose, em maior número do que nos Grupos I e II. Na lâmina própria, identificavam-se duas regiões distintas: uma subjacente ao epitélio, com predomínio de células, e outra, próxima ao miométrio, onde havia predomínio de fibras colágenas. De maneira geral, na lâmina própria verifica-se grande concentração de fibroblastos, macrófagos e leucócitos, sobretudo eosinófilos. Estes últimos apareciam em maior concentração na região adjacente ao miométrio e nas áreas próximas aos vasos sanguíneos (Fig. 16).

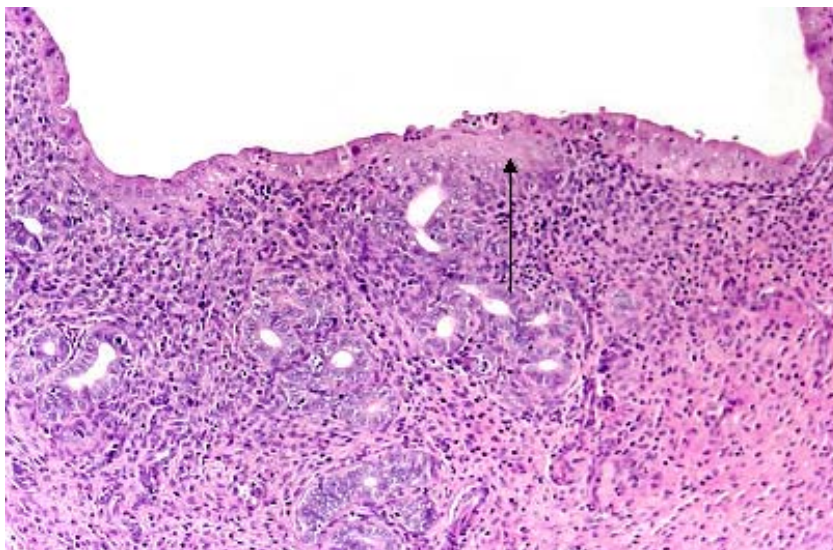


Fig. 16 - Fotomicrografia de corte histológico do útero de rata pertencente ao Grupo V (luz contínua e tratada com veículo) durante fase de proestro. Notar área contendo epitélio estratificado intercalado entre o epitélio cilíndrico simples (seta). Observar infiltração leucocitária tanto no epitélio superficial quanto no estroma. HE.

4.4.6 - GVI (ratas submetidas à luz contínua e tratadas com melatonina) A morfologia endometrial era semelhante a dos Grupos controle (GI) e *sham* (GII). Observava-se endométrio revestido por epitélio cilíndrico simples, com núcleos elípticos localizados na região central ou ligeiramente deslocados para a base, com um ou dois nucléolos bem evidentes. Encontraram-se, também, figuras de mitose e infiltração leucocitária. O estroma achava-se constituído por duas regiões bem delimitadas: uma mais celular e estreita situada logo abaixo do epitélio de revestimento; e outra mais densa, rica em fibras colágenas, principalmente ao redor das glândulas, a qual se estendia até o miométrio. Próximos dessas glândulas havia grande quantidade de eosinófilos. Além disso, a maioria das glândulas intersticiais era revestida por epitélio cúbico simples (Fig. 17).

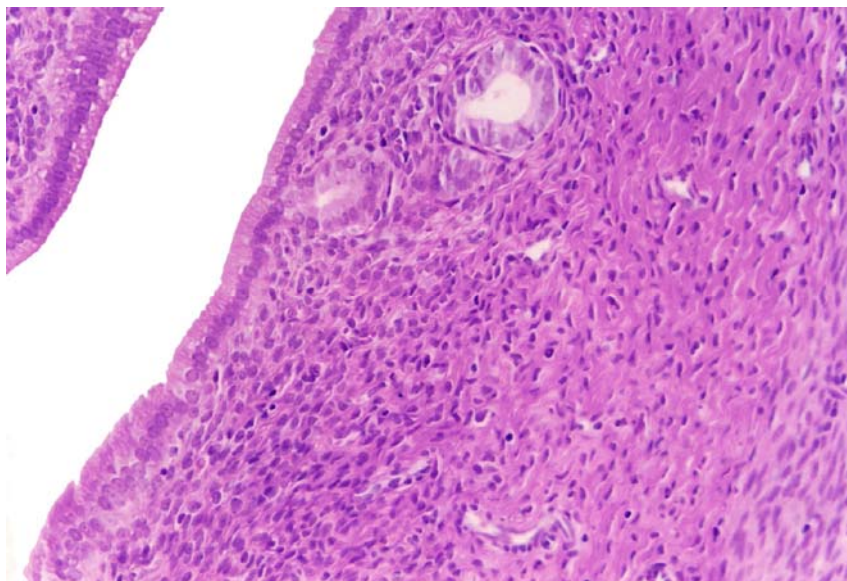


Fig. 17 - Fotomicrografia de corte histológico do útero de rata do Grupo VI (luz contínua e tratada com melatonina) durante a fase proestro. Notar epitélio superficial do tipo cilíndrico simples com áreas de pseudo-estratificação. Observar infiltração leucocitária tanto no epitélio superficial quanto no estroma. HE (

4.5 - Histomorfometria do útero

Os dados da histomorfometria do corno uterino estão expressos na Tabela 3 e nas Figuras 18 a 21. A espessura endometrial e do epitélio luminal e o número de eosinófilos foram estatisticamente maiores nos Grupos III e V em comparação aos Grupos controle (GI e GII). Em relação ao miométrio, não houve modificações significantes.

Tabela 3 - Médias e desvios-padrão dos parâmetros histomorfométricos do útero de rata nos grupos estudados

	GI	GII	GIII	GIV	GV	GVI
E. endometrial ($\mu\text{m}^2 \times 10$)	96,2 \pm 10,9	86,3 \pm 12,1	179,2 \pm 23,3 ^a	139,3 \pm 22,3	183,6 \pm 23,3 ^a	142,1 \pm 20,1
E. epitelial luminal ($\mu\text{m}^2 \times 10$)	6,0 \pm 0,5	6,3 \pm 1,1	11,9 \pm 0,9 ^b	7,7 \pm 1,2	12,1 \pm 1,4 ^b	8,90 \pm 1,9
E. miometrial ($\mu\text{m}^2 \times 10$)	152,2 \pm 65,2	140,8 \pm 48,2	290,1 \pm 53,2	158,4 \pm 52,8	340,1 \pm 65,2	190,1 \pm 43,2
N.º Eosinófilos	24,5 \pm 2,3	25,9 \pm 2,1	49,1 \pm 3,2 ^c	30,1 \pm 8,9	56,4 \pm 2,1 ^c	44,2 \pm 6,1

E = espessura

a, b e c – $p < 0,01$ comparados aos Grupos I e II

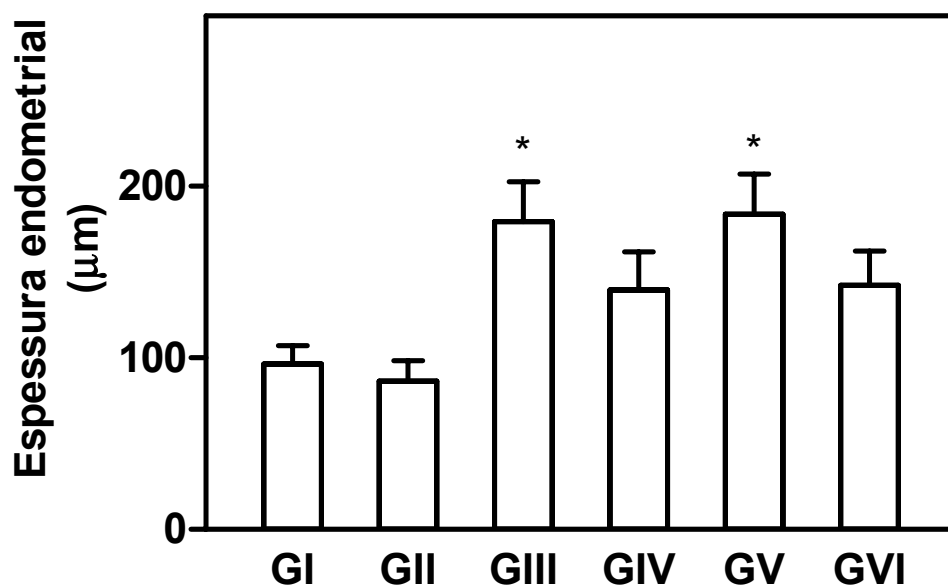


Fig. 18 – Representação gráfica da espessura endometrial nos grupos estudados.

* $p < 0,01$ comparado aos Grupos I e II

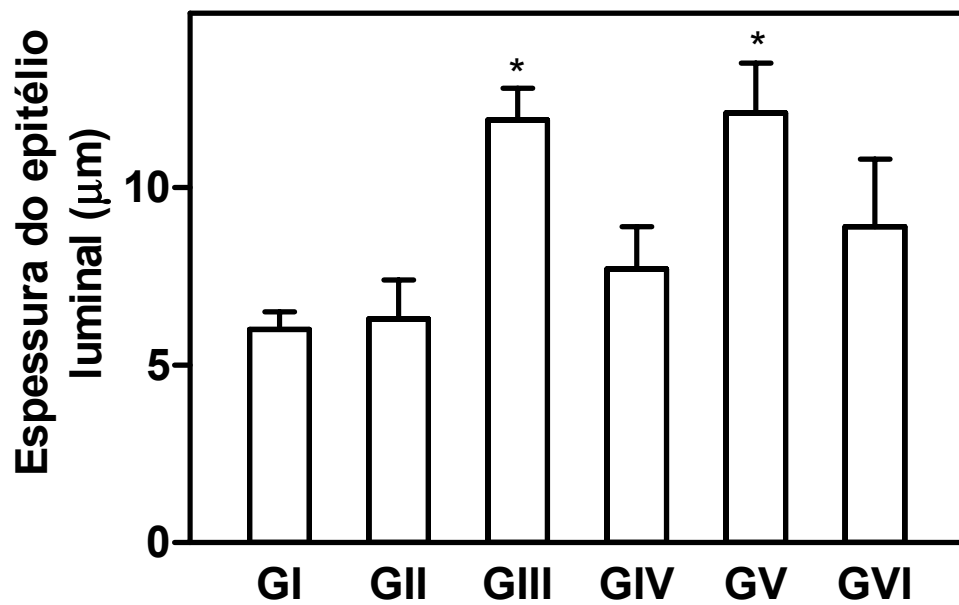


Fig. 19 – Representação gráfica da espessura do epitélio luminal nos grupos estudados.

* $p < 0,01$ comparado aos Grupos I e II

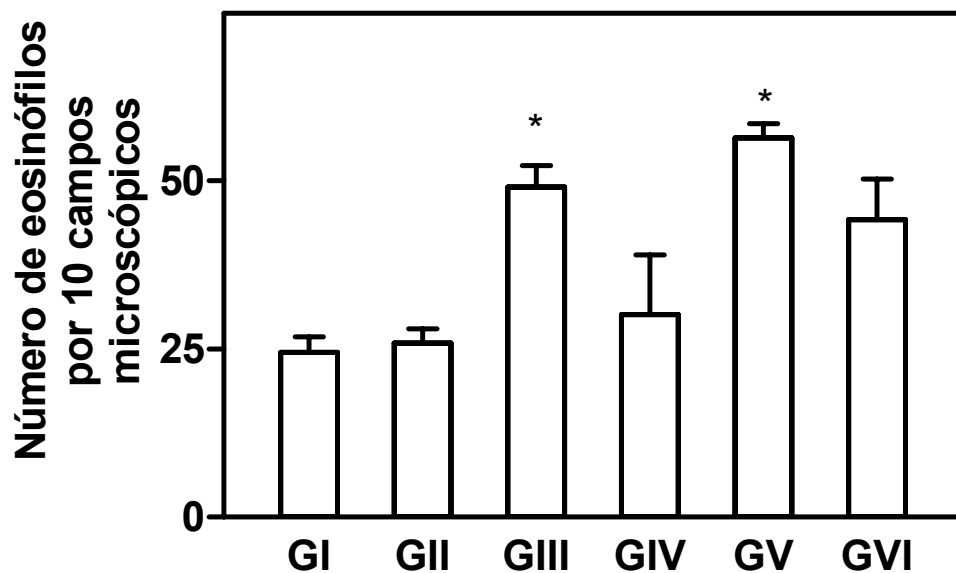


Fig. 20 – Representação gráfica do número de eosinófilos por 10 campos microscópicos nos grupos estudados.

* $p < 0,01$ comparado aos Grupos I e II

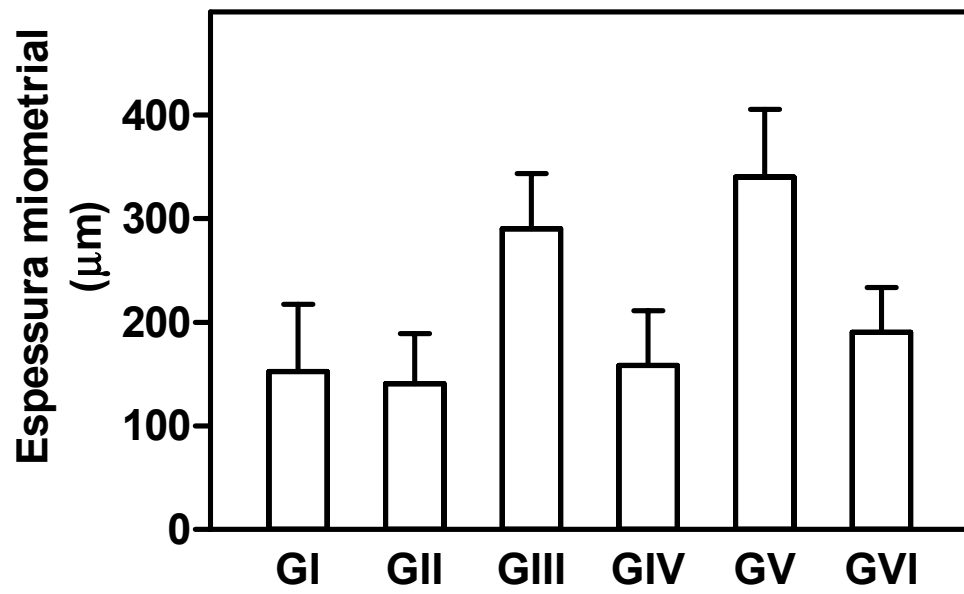


Fig. 21 – Representação gráfica da espessura miometrial nos grupos estudados. Não houve diferença significativa entre os grupos.

5- DISCUSSÃO

Inicialmente, gostaríamos de realçar alguns aspectos relevantes de nosso projeto. Sabe-se que após a pinealectomia, os níveis séricos de melatonina levam, em média, quatro semanas para mostrar redução importante. Tal fato deve-se à produção por outras fontes, que tentam compensar a queda decorrente da retirada da glândula, como a retina, a glândula Harderiana e o intestino grosso (MASANA & DUBOCOVICH, 2001). Por este motivo, efetuamos o tratamento por três meses. Outro dado importante a ser considerado é que o tratamento no período noturno mimetiza as altas concentrações que ocorrem nesse período, as quais são essenciais para as funções fisiológicas (TEIXEIRA et al., 2004). Além disso, para sensibilizar as ratas estabelecemos o ciclo claro/escuro de 10 horas para o período claro e de 14 horas para o escuro (PERTSOV, 2006), aumentando a exposição à melatonina nos Grupos controles (I e II), bem como no que recebeu melatonina (Grupo IV - pinealectomizado).

Como se sabe, a melatonina, principal hormônio da glândula pineal, é largamente relacionada com a função reprodutiva (REITER, 1986; MASANA & DUBOCOVICH, 2001). De fato, o envolvimento da melatonina na função ovariana pode ser feito de modo indireto, pela alteração das gonadotrofinas (DARDES et al., 2000), ou diretamente, no ovário e pela ativação de seu receptor do tipo I ou II (SOARES Jr. et al., 2003b). Demonstrou-se que as ratas que têm menor concentração sérica de melatonina desenvolvem estado de redução da liberação oocitária, bem como redução do corpo lúteo e aumento do número de cistos na periferia do ovário (TEIXEIRA et al., 2004).

Além disso, esses animais apresentam tanto queda da produção de progesterona, como foi demonstrado em nosso trabalho, quanto dos receptores de progesterona no endométrio (SOARES Jr. et al., 2003a). Assim, as evidências

experimentais mostram que este hormônio, em roedores, é importante para o crescimento folicular (GIUDICE, 2001).

O IGF-I pertence à família de fatores de crescimento polipeptídico com estrutura e função similar a da insulina (WANG & CHARD, 1999). Em camundongos que não o produzem, a maturação folicular é interrompida e os animais são inférteis. Além disso, nestes animais, a deficiência deste fator leva a alterações na proliferação das células da granulosa e na produção de estrogênio, elevando os níveis séricos estrínicos (KADAKIA et al., 2001). Salienta-se, ainda, que este fator aumenta a produção de progesterona em cultura de células da granulosa-lútea pela ativação do gene STAR (ZELEZNIK et al., 2002).

Nosso estudo oferece dados relevantes sobre a ação da melatonina, visto que esta ainda não se encontra totalmente compreendida, mostrando sua influência no efeito do IGF-I. Observamos que, junto com a redução dos níveis de IGF-I, nos animais pinealectomizados e nos que permaneceram sob luz contínua também ocorreu diminuição dos índices de progesterona. Possivelmente, este fato estaria relacionado com a queda da taxa de ovulação e com distúrbios na gestação desses animais (TEIXEIRA et al., 2004).

Os fatores de crescimento insulina símile-I (IGF-I) elevam a sensibilidade das células da granulosa ao FSH (ERICKSON et al., 1989; MOURA, 1995), aumentando a possibilidade do IGF-I estar envolvido na mediação da seleção folicular. Assim, a concentração insuficiente de IGF-I em pequenos folículos antrais poderia levar à falência da seleção folicular. Além disso, a redução da fração livre do IGF-I no folículo poderia diminuir a sensibilidade das células da granulosa ao FSH, que, ao que parece, é essencial para a seleção do folículo dominante (ERICKSON et al., 1989).

Outros estudos mostraram haver queda da concentração de IGF-I após a retirada da pineal, a qual se recupera depois do tratamento com melatonina (LADIZESKY et al., 2001; OSTROWSKA et al., 2003). Esse fato foi também confirmado em nosso estudo. Assim, a melatonina interferiria no eixo GH e IGF-I (SABRY & REITER, 1988). De fato, esse hormônio estimula a liberação de GH em cultura de células da adenohipófise (JUSZCZAK & MICHALSKA, 2006). Além disso, a produção hepática de IGF-I depende da concentração sérica de GH. Desse modo, a redução nos níveis circulantes se refletiria na quantidade sérica de IGF-I (MELMED, 1990). Contudo, a ministração de melatonina em animais sob efeito da luz contínua não se relacionou com o aumento de IGF-I.

O efeito da luz contínua sobre a pineal resulta na supressão da produção de indolaminas, sobretudo de melatonina. É, pois, considerado por alguns autores como uma pinealectomia funcional (MUSTONEN et al., 2002). Entretanto, a reposição de melatonina não recuperou os níveis prévios de IGF-I nos animais sob luz contínua. Possivelmente, outros mecanismos neuro-endócrinos estariam envolvidos nestes animais, como o aumento do sistema dopaminérgico. Além disso, a luz contínua causaria alteração hepática por estresse oxidativo (BAYDAS et al., 2001). Possivelmente, a dose fisiológica ministrada não foi suficiente para reverter este processo, ou seja, elevar os níveis de IGF-I.

Fotoperíodos longos deprimem o IGF-I em hamsters fêmeas e aumenta em machos. Acredita-se que existe um dimorfismo sexual na concentração de IGF-I circulante em hamsters Syrian, que pode estar relacionado com a presença dos esteróides gonadais (VAUGHAN et al., 1994). Contudo, este fenômeno ainda não foi confirmado em ratos. Em relação à dosagem hormonal de esteróides sexuais, constatamos haver redução de progesterona e elevação de estrogênio em ratas

pinealectomizadas e nas sob luz contínua. Este fato já havia sido demonstrado anteriormente por nosso grupo (SOARES Jr. et al., 2003a). Além disso, esta alteração relaciona-se com a cornificação vaginal resultante da ação persistente do estrogênio (KINSON & PEAT, 1971). Ocorreria, ainda, a redução do número de embriões implantados no endométrio de ratas, resultado da diminuição oocitária liberada, assim como do endométrio inadequado (TEIXEIRA et al., 2004).

É oportuno salientar que mulheres com anovulação crônica, sobretudo as com ovários policísticos, apresentam níveis elevados de melatonina sérica (LUBOSHITZKY et al., 2003). Estes autores sugerem haver ligação entre a pineal e este distúrbio ovulatório. Notaram que a reposição com melatonina em ratas pinealectomizadas normalizou os níveis dos esteróides sexuais, principalmente, de estrogênio e de progesterona. Contudo, a recuperação em animais submetidos à luz contínua foi bem menor após o tratamento. Possivelmente, este fenômeno estaria relacionado com os níveis baixos de IGF-I nesses animais. Haveria, pois, exacerbação do sistema dopaminérgico nos animais sob luz contínua.

Outro fato interessante em nosso estudo foi o comportamento da testosterona total. A pinealectomia e a luz contínua não elevaram significativamente a produção de testosterona total em ratas. Entretanto, após a ministração de melatonina, detectou-se redução dos níveis deste hormônio nos grupos que foram submetidos aos experimentos. De igual modo, outros estudos em ratas demonstraram não haver alteração significativa das concentrações de androgênios nos animais pinealectomizados (SOARES Jr. et al., 2003a). Já em machos da mesma espécie, a pinealectomia aumentou significativamente a produção de androgênios pelas células de Leydig do testículo, o qual se normalizou com a ministração de melatonina (KUS et al., 2002). Possivelmente, grande parte da testosterona produzida em ratas

fêmeas seria convertida em estrogênios, dificultando a detecção das variações em relação aos controles.

É oportuno relatar que pacientes com a síndrome de ovários policísticos e com hiperandrogenismo apresentam níveis elevados de melatonina em comparação às mulheres normais ou com hirsutismo idiopático (LUBOSHITZKY et al., 2003). Este fato seria o oposto ao encontrado em ratas fêmeas que foram pinealectomizadas e que receberam melatonina. A razão deste ainda não é bem conhecida.

O efeito da melatonina sobre a esteroidogênese ovariana pode ser feito por ação central, por meio dos receptores de melatonina (MT1 ou MT2) localizados no hipotálamo e na hipófise (MASANA & DUBOCOVICH, 2001) ou por ação periférica, diretamente no ovário (BITTMAN, 1993; SUNDARAM et al., 1993; YAVARONE et al., 1993; AYRE et al., 1994; MUKHOPADHYAY et al., 1995; SOARES Jr. et al., 2003b).

Experimentos em ratas mostraram que a ministração de melatonina bloquearia a atividade ovariana de ratas, reduzindo o peso ovariano e a produção de esteróides sexuais (REITER et al., 2005). Em nosso meio, DARDES et al. (2000) demonstraram haver, após a pinealectomia, aumento da relação LH/FSH em ratas. Este fato poderia justificar as alterações morfológicas ovarianas comprovadas em nosso estudo, bem como em outros trabalhos (PRATA LIMA, 1998; SOARES Jr. et al., 2003a).

Na histomorfologia, encontramos aumento da espessura do epitélio de revestimento dos ovários das ratas que tiveram redução da concentração sérica de 6-sulfatoximelatonina, tanto devido à pinealectomia quanto à exposição à luz contínua. Nestes animais observamos aumento da produção de estrogênio e queda da progesterona. Alguns estudos *in vitro* e *in vivo* mostraram que o estrogênio em

concentração elevada, por período prolongado, pode promover transformação das células epiteliais, as quais são normalmente cubóides, em células cilíndricas ou epitélio pseudo-estratificado (DIEL et al., 2006; MOSQUETTE et al., 2007). Outros autores verificaram que a elevação das gonadotrofinas, principalmente de LH, poderia ter efeito proliferativo no epitélio de revestimento ovariano tanto em seres humanos quanto em animais (DIEL et al., 2006; SEVAL et al., 2006; MOSQUETTE et al., 2007). Possivelmente, em nosso estudo, a ação desses dois fatores, assim como o aumento da relação LH/FSH nos animais pinealectomizados, como referido por DARDES et al. (2000), justificaria o aumento de mitose registrado nos folículos ovarianos.

Segundo GURAYA e UPPAL (1978), as glândulas intersticiais do estroma ovariano podem originar-se de folículos atresícos ou de células oriundas da hipertrofia da teca interna. Por este último fato, há concordância entre o aumento de mitose nos animais com redução de melatonina e o incremento de células intersticiais. Outros estudos mostraram haver hipertrofia dos folículos ovarianos (LEWINSKI et al., 1993) e aumento das glândulas intersticiais ovariana após a pinealectomia (SOARES Jr. et al., 2003a). Este fato explicaria o aumento volumétrico dos ovários relatados em outros estudos (PRATA LIMA et al., 2004). Verificamos, em nosso trabalho, que estas células intersticiais também se achavam aumentadas nos grupos com redução de melatonina.

As células intersticiais do estroma ovariano são muito semelhantes às da teca interna, tanto do ponto de vista morfológico (SOARES Jr. et al., 2003a) quanto funcional, podendo, inclusive, produzir esteróides sexuais, especialmente androgênios (GURAYA & UPPAL, 1978; LINDEQUE et al., 1986). Outros estudos reforçaram esta informação, demonstrando haver atividade enzimática importante

para a síntese androgênica (BROOK & CLARKE, 1989; GILLING-SMITH et al., 1994). Em nosso estudo, as células intersticiais seriam oriundas de folículos atresícos.

Em 2003a, SOARES Jr. et al. demonstraram, por microscopia eletrônica, haver acúmulo de vesículas lipídicas nas células intersticiais do estroma ovariano. Assim, estas teriam capacidade aumentada de esteroidogênese. Em nosso estudo, observamos redução do número dessas células nos animais pinealectomizados que receberam melatonina em relação ao grupo pinealectomizado que recebeu apenas veículo. Possivelmente, outras alterações estariam atuando nos animais sob luz contínua, como, por exemplo, elevação de neurotransmissores, em especial de dopamina (CASTANEDA et al., 2004).

O distúrbio da função ovariana com maior produção de estrogênio e redução de progesterona poderia ser o principal responsável pela proliferação endometrial nos grupos com queda da produção de melatonina. Esse mesmo fenômeno poderia explicar o aumento de eosinófilos no endométrio desses animais. Antes do início do projeto, nossa expectativa era que as alterações de proliferação estariam relacionadas com o estrogênio e com o IGF-I. Contudo, esse último teve comportamento oposto. A explicação para esse fato poderia ser a ação direta do estrogênio sobre o IGF-I (BOTTER & WUTTKE, 2006).

Em ratas castradas, a redução dos níveis de estradiol se acompanha de aumento de IGF-I, enquanto a reposição estrogênica acarreta diminuição desses níveis (BOTTNER & WUTTKE, 2006). Tal fato decorreria do aumento da produção de IGFBP e de albumina no fígado pela ação estrogênica (RICCIARELLI et al., 1991). Outro dado importante seria a ação do estrogênio diretamente no endométrio (GHAHARY & MURPHY, 1989; CARLSSON & BILLIG, 1991). A ação estrogênica é

importante para aumentar a expressão dos receptores de IGF-I, bem como a produção local deste fator de crescimento no estroma endometrial. Esta produção local seria a responsável pelo aumento de mitose e maior proliferação do epitélio endometrial (SATO et al., 2002). Contudo, este incremento não se refletiria na concentração sérica do IGF-I. Por esta razão, o aumento da produção de estrogênio não é acompanhado da elevação dos níveis de IGF-I.

O tratamento com melatonina não reverteu totalmente os efeitos endometriais determinados pela luz contínua e pela pinealectomia. Esse fato poderia ser explicado pelas alterações causadas pela luz contínua nos sistemas dopaminérgico e noradrenérgico, os quais, por sua vez, podem determinar alterações endócrinas e no sistema reprodutor (KEMPF et al., 1982). Há a necessidade de estudos com maior duração para avaliar o endométrio nas ratas pinealectomizadas que receberam melatonina.

Em suma, nosso estudo mostra que a redução de melatonina determina alterações endócrinas, ovarianas e endometriais importantes que podem comprometer a fertilidade. Novas pesquisas devem ser realizadas para melhor aquilatar os efeitos da melatonina no sistema reprodutor.

6- CONCLUSÕES

O presente estudo permite-nos concluir que a redução dos níveis séricos de melatonina pela pinealectomia ou exposição à luz contínua:

1- Determinou elevação dos níveis séricos do estrogênio e redução significativa das taxas de progesterona e de IGF-I. Já o tratamento com melatonina reverteu este estado nos animais pinealectomizados, mas não nos submetidos à luz contínua. Os níveis androgênicos foram mais altos nos animais que tinham baixos níveis de melatonina.

2- Proporcionou alterações histomorfológicas nos ovários, as quais foram restauradas pela reposição de melatonina, tanto nos folículos ovarianos, como no epitélio e no estroma (células intersticiais). Contudo, o efeito deste hormônio tem menor impacto no epitélio de revestimento dos animais sob luz contínua.

3- Relacionou-se com proliferação do endométrio, efeito que não desapareceu totalmente nos animais submetidos à pinealectomia ou à luz contínua e que foram tratados com melatonina.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALONSO-SOLIS, R.; ABREU, P.; FAJARDO, N.; HERNÁNDEZ-DÍAZ, F.; DÍAZ-CRUZ, A.; HERNÁNDEZ, G.; SÁNCHEZ-CRIADO, J. - Ovarian hormones regulate alpha1 and beta-adrenoceptor interactions in female rata pinealocytes. **Neuroreport.**, **6**: 345-8, 1995.

ASDEL, S. A. - **Patterns of mammalian reproduction**. 2nd. Ed. Cornell Univ. Press Ithaca New York, 1964.

AYRE, E.A. & PANG, S.F. - ¹²⁵I iodomelatonin binding sites in the testis and ovary: putative melatonin receptors in the gonads. **Biol. Signals**, **3**: 71-84, 1994.

AYRE, E.A., WANG, Z.P.; BROWN, G.M.; PANG, S.F. - Localization and characterization of [125I] iodomelatonin binding sites in duck gonads. **J. Pineal Res.**, **17**: 39-47, 1994.

BARATTA, M. & TAMANINI, C. - Effect of melatonin on the in vitro secretion of progesterone and estradiol 17 beta by ovine granulosa cells. **Acta Endocrinol.**, **127**: 366-70, 1992.

BAYDAS, G.; ERCEL, E.; CANATAN, H.; DONDER, E.; AKYOL A. - Effect of melatonin on oxidative status of rat brain, liver and kidney tissues under constant light exposure. **Cell Biochem. Funct.**, **19**: 37-41, 2001.

BHAGAT, L.; DURAISWAMI, S.; MURALIDHAR, K. - Mode of action of inhibin-like pineal antigonadotropin is different from melatonin during compensatory ovarian hypertrophy. **J. Pineal. Res.**, **16**: 193-7, 1994.

BITTMAN, R. - Mycoplasma membrane lipids. Chemical composition and transbilayer distribution. **Subcell Biochem.**, **20**: 29-52, 1993.

BJERSING, L. & BORGLIN, N.E. - Effect of hormones on incidence of uterine eosinophilia in rats. **Acta Path. Microbiol. Scand.**, **60**: 27-35, 1964.

BOTTNER, M. & WUTTKE, W. - Chronic treatment with physiological doses of estradiol affects the GH-IGF-1 axis and fat metabolism in young and middle-aged ovariectomized rats. **Biogerontology**, **7**: 91-100, 2006.

BROOK, F.A. & CLARKE, J.R. - Ovarian interstitial tissue of the wood mouse, *Apodemus sylvaticus*. **J. Reprod. Fertil.**, **85**: 251-60, 1989.

BRZEZINSKI, A.; SEIBEL, M.M.; LYNCH, H.J.; DENG, M.H.; WURTMAN, R.J. - Melatonin in human preovulatory follicular fluid. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, **64**: 865-7, 1987.

BRZEZINSKI, A.; BEN-SHUSHAN, A.; WEINSTEIN, D. - Menopause and hormone replacement therapy in relation to atherosclerotic heart disease. **Harefuah**, **120**: 419-21, 1991.

BRZEZINSKI, A.; FIBICH, T.; COHEN, M.; SCHENKER, J.G.; LAUFER, N. - Effects of melatonin on progesterone production by human granulosa lutein cells in culture.

Fertil. Steril., **58**: 526-9, 1992.

CALAGERO, A.E.; BARRECA, A.; BURRELLO, N.; PALERMO, I.; GIORDANO, G.; D'AGATA, R.; VICARI, E. - Corticotrophin-releasing hormone inhibits insulin-like growth factor-I release from primary cultures of rat granulosa cells. **J. Endocrinol.**, **174**: 493-8, 2002.

CAMANO, L. & GIUFFRIDA, R. - Modificações citológicas e histológicas do epitélio vaginal da rata. **Mater. Inf.**, **29**: 231-54, 1970.

CARLSSON, B. & BILLIG, H. - Insulin-like growth factor-I gene expression during development and estrous cycle in the rat uterus. **Mol. Cell Endocrinol.**, **77**: 175-80, 1991.

CASTANEDA, T.R.; DE PRADO, B.M.; PRIETO, D.; MORA, F. - Circadian rhythms of dopamine, glutamate and GABA in the striatum and nucleus accumbens of the awake rat: modulation by light. **J. Pineal Res.**, **36**: 177-85, 2004.

DAHLGREN, E.; LANDIN, K.; KROTKIEWSKI, M.; HOLM, G.; JANSON, P.O. - Effects of two antiandrogen treatments on hirsutism and insulin sensitivity in women with polycystic ovary syndrome. **Hum. Reprod.**, **13**: 2706-11, 1998.

DAIR, E.L. - **Aspectos morfológicos e morfométricos do endométrio de ratas adultas pinealectomizadas ou expostas à luz contínua, com e sem reposição de melatonina.** São Paulo, 2001, 94p. [Tese de Mestrado - Universidade Federal de São Paulo - Escola Paulista de Medicina].

DARDES, R.C.M.; BARACAT, E.C.; SIMÕES, M.J. - Modulation of estrous cycle and LH, FSH and melatonin levels by pinealectomy and sham-pinealectomy in female rats. **Prog. Neuro-Psycopharmacol. & Biol. Psychiat.**, **24**: 441-453, 2000.

DIEL, P.; HERTRAMPF, T.; SEIBEL, J.; LAUDENBACH-LESCHOWSKY, U.; KOLBA, S.; VOLLMER, G. - Combinatorial effects of the phytoestrogen genistein and of estradiol in uterus and liver of female Wistar rats. **J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.**, **102**: 60-70, 2006.

ERICKSON, G.F.; GARZO, V.G.; MAGOFFIN, D.A. - Insulin-like growth factor-I (IGF-I) regulates aromatase activity in human granulosa and granulosa luteal cells. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, **69**: 716-724, 1989.

ERLICH, S.S. & APUZZO, M.L. - The pineal gland anatomy, physiology and clinical significance. **J. Neurosurg.**, **63**: 321-41, 1985.

FISKE, V.M.; PARKER, K. L.; ULMER, R. A.; HOON, O.; AZZIZ, N. - Effect of melatonin alone or in combination with human chorionic gonadotropin or ovine luteinizing hormone on the in vitro secretion of oestrogen or progesterone by granulosa cells of rats. **Endocrinol.**, **114**: 407-10, 1984.

FREEMAN, M.F. - The neuroendocrine control of the ovarian cycle of the rat. In: KUOBIL, E. & NEIL, J.D. (Eds.). **The physiology of reproduction**. 2nd. edition, New York: Raven Press, p. 613-53, 1994.

GHAHARY, A. & MURPHY, L.J. - Uterine insulin-like growth factor-I receptors: regulation by estrogen and variation throughout the estrous cycle. **Endocrinology**, **125**: 597-604, 1989.

GILLING-SMITH, C.; WILLIS, D.S.; BEARD, R.W.; FRANKS, S. - Hypersecretion of androstenedione by isolated thecal cells from polycystic ovaries. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, **79**: 1158-65, 1994.

GITTES, R.F. & CHU, E.W. – Reversal of the effect of pinealectomy in female rats by multiple isogeneic pineal transplants. **Endocrinology**, **77**: 1061-7, 1965.

GIUDICE, L.C. - Insulin-like growth factor family in Graafian follicle development and function. **J. Soc. Gynecol. Investig.**, **8**: 26-9, 2001.

GURAYA, S.S. & UPPAL, J. - Morphological and histochemical studies on the foetal and postnatal ovaries of the field rat (*Millardia meltda*). **Acta Morphol. Neerl. Scand.**, **16**: 287-304, 1978.

JOHNSON, L.Y.; VAUGHAN, M.K.; RICHARDSON, B.A.; PETTERBORG, L.J.; REITER, R.J. - Variation in pineal melatonin content during the estrous cycle of the rat. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, **169**: 416-19, 1982.

JUSZCZAK, M. & MICHALSKA, M. - The effect of melatonin on prolactin, luteinizing hormone (LH), and follicle-stimulating hormone (FSH) synthesis and secretion.

Postepy. Hig. Med. Dosw., **60**: 431-8, 2006.

KADAKIA, R.; ARRAZTOA, J.A.; BONDY, C.; ZHOU, J. - Granulosa cell proliferation is impaired in the Igf1 null ovary. **Growth Horm. IGF Res.**, **11**: 220-4, 2001.

KEMPF, E.; MANDEL, P.; OLIVERIO, A.; PUGLISI-ALLEGRA, S. - Circadian variations of noradrenaline, 5-hydroxytryptamine and dopamine in specific brain areas of C57Bl/6 and BALB/c mice. **Brain Res.**, **232**: 472-8, 1982.

KINSON, G.A. & PEAT, F. - The influences of illumination, melatonin, and pinealectomy on testicular functions in the rat. **Life Sci.**, **10**: 259-69, 1971.

KNIAZEWSKI, B.; OSTROWSKA, Z.; ZWIRSKA-KORCZALA, K.; BUNTNER, B. - The influence of pinealectomy and single dose of melatonin administered at different times of day on serum T3 and T4 concentrations in rats. **Acta Physiol. Pol.**, **41**: 117-261, 1990a.

KNIAZEWSKI, B.; SOBIERAJ, H.; ZWIRSKA-KORCZALA, K. BUNTNER, B.; OSTROWSKA, Z. - The influence of exogenous melatonin on thyroid secretion in pinealectomized rats. **Endocrinol. Exp.**, **24**: 317-324, 1990b.

KUS, I.; AKPOLAT, N.; OZEN, O.A.; SONGUR, A.; KAVAKLI, A.; SARSILMAZ, M. - Effects of melatonin on Leydig cells in pinealectomized rat: an immunohistochemical study. **Acta Histochem.**, **104**: 93-7, 2002.

LADIZESKY, M.G.; CUTRERA, R.A.; BOGGIO, V.; SOMOZA, J.; CENTRELLA, J.M.; MAUTALEN, C.; CARDINALI, D.P. - Effect of melatonin on bone metabolism in ovariectomized rats. **Life Sci.**, **70**: 557-65, 2001.

LANG, C.L. - **Efeito da pinealectomia sobre a apoptose do endométrio de ratas adultas**. São Paulo, 2001, 98p. [Tese de Mestrado - Universidade Federal de São Paulo - Escola Paulista de Medicina].

LEWINSKI, A; SZYMCZYKIEWICZ, P; SEWERYNEK, E; WAYS, E. - Effects of pinealectomy and melatonin administration on certain indices of ovarian hyperplasia and/or hypertrophy in rats with both ovaries intact or after unilateral ovariectomy. **J. Pineal Res.**, **14**: 117-27, 1993.

LINDEQUE, M.; SKINNER, J.D.; MILLAR, R.P. - Adrenal and gonadal contribution to circulating androgens in spotted hyaenas (*Crocuta crocuta*) as revealed by LHRH, hCG and ACTH stimulation. **J. Reprod. Fertil.**, **78**: 211-7, 1986.

LUBOSHITZKY, R.; SHEN-ORR, Z.; HERER, P.; NAVE, R. - Urinary 6-sulfatoxymelatonin excretion in hyperandrogenic women with polycystic ovary syndrome: the effect of ethinyl estradiol-cyproterone acetate treatment. **Gynecol. Endocrinol.**, **17**: 441-7, 2003.

MASANA, M.I. & DUBOCOVICH, M.L. - Melatonin receptor signaling: finding the path through the dark. **Sci. STKE**, **6**: 39, 2001.

MASANA, M.I.; SOARES, J.M. JR.; DUBOCOVICH, M.L. - 17Beta-estradiol modulates hMT1 melatonin receptor function. **Neuroendocrinology**, **81**: 87-95, 2005.

MELMED, S. - Acromegaly. **N. Engl. J. Med.**, **322**: 966-77, 1990.

MESS, B. - Interaction between pineal and non-reproductive endocrine gland. In: AXELROD, J.; FRASCHINI, F.; VELO, G.P. (Eds). **The pineal gland and its endocrine role**, New York: Plenum Press, p. 477-508, 1983.

MOSQUETTE, R.; SIMOES, M.D.; DA SILVA, I.D.; OSHIMA, C.T.; OLIVEIRA-FILHO, R.M.; HAIDAR, M.A.; SIMOES, R.S.; BARACAT, E.C.; SOARES, J.M. Jr. - The effects of soy extract on the uterus of castrated adult rats. **Maturitas**, **56**: 173-83, 2007.

MOURA, M.D. - **Efeito do fator de crescimento tipo I (IGF-I) na produção hormonal pelas células da granulosa. Modulação sobre a atividade e expressão gênica das principais enzimas esteroideogênicas**. Ribeirão Preto, 1995, 92p. [Tese de Livre Docência apresentada ao Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo].

MUKHOPADHYAY, B.; BISWAS, R.; BHATTACHARYA, S. - Gonadotropin releasing hormone stimulation of cyclic 3', 5'-AMP in the pituitary cell of a teleost (*Channa punctatus*, Bloch) requires extracellular calcium: its relationship to gonadotropin release. **Gen. Comp. Endocrinol.**, **97**: 353-65, 1995.

MUSTONEN, A.M.; NIEMINEN, P.; HYVARINEN, H. - Effects of continuous light and melatonin treatment on energy metabolism of the rat. **J. Endocrinol. Invest.**, **25**: 716-23, 2002.

OCAL-IREZ, T; DURMUS, G.; SEKERKIRAN, Y.; PEKER, C.; UYGUR, G. - Effect of a pineal indolamine, 5-methoxyindole-3-acetic acid, on the estrous cycle and reproductive organs of female Wistar albino rats. **Brain Research**, **493**: 1-7, 1989.

OJEDA, J.R. & URBANSKI, H.F. - Puberty in the rat. In: KNOBIL, E. & NEILL, J.D. (Eds). **The Physiology of Reproduction**, 2nd edition, Vol. 2, New York: Raven Press, p. 363-409, 1994.

OSTROWSKA, Z.; KOS-KUDLA, B.; MAREK, B.; SWIETOCHOWSKA, E.; GORSKI, J. - Assessment of the relationship between circadian variations of salivary melatonin levels and type I collagen metabolism in postmenopausal obese women. **Neuroendocrinol. Lett.**, **22**: 121-127, 2001a.

OSTROWSKA, Z.; KOS-KUDLA, B.; SWIETOCHOWSKA, E.; MAREK, B.; KAJDANIUK, D.; CIESIELSKA-KOPACZ, N. - Influence of pinealectomy and long-

term melatonin administration on GH-IGF-I axis function in male rats. **Neuro Endocrinol. Lett.**, **22**: 255-62, 2001b.

OSTROWSKA, Z.; KOS-KUDLA, B.; NOWAK, M.; SWIETOCHOWSKA, E.; MAREK, B.; GORSKI, J.; KAJDANIUK, D.; WOLKOWSKA, K. - The relationship between bone metabolism, melatonin and other hormones in sham-operated and pinealectomized rats. **Endocr. Regul.**, **37**: 211-24, 2003.

OZAKI, Y.; WURTMAN, R.J.; ALONSO, R.; LYNCH, H.J. – Melatonin secretion decreases during the proestrous stage of the rat estrous cycle. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA.**, **75**: 531-4, 1978.

PERTSOV, S.S. - The behavior of rats in response to changes in the light regime and administration of melatonin. **Neurosci. Behav. Physiol.**, **36**: 767-72, 2006.

PRATA LIMA, M.F. - **Efeitos da melatonina sobre a morfo-fisiologia do ovário de ratas submetidas à pinealectomia ou expostas à luz contínua.** São Paulo - 1998 107p. [Tese de Doutorado - Escola Paulista de Medicina].

PRATA LIMA, M.F.; BARACAT, E.C.; SIMOES, M.J. - Effects of melatonin on the ovarian response to pinealectomy or continuous light in female rats: similarity with polycystic ovary syndrome. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, **37**: 987-95, 2004.

PREMOLI, A.C.; SANTANA, L.F.; FERRIANI, R.A.; MOURA, M.D.; DE SA, M.F.; REIS, R.M. - Growth hormone secretion and insulin-like growth factor-1 are related

to hyperandrogenism in nonobese patients with polycystic ovary syndrome. **Fertil. Steril.**, **83**: 1852-5, 2005.

REICHLIN, S. - The pineal gland. In: WILSON, J.D. & FOSTER, D.W. (Eds.) **Willians textbook of endocrinology**. 8th edition, Philadelphia: WB Saunders, p.240-53, 1992.

REITER, R.J. - Normal patterns of melatonin levels in the pineal gland and body fluids of humans and experimental animals. **J. Neural. Transm. Suppl.**, **21**: 35-54, 1986.

REITER, R.J.; TAN, D.X.; MALDONADO, M.D. - Melatonin as an antioxidant: physiology versus pharmacology. **J. Pineal Res.**, **39**: 215-6, 2005.

RICCIARELLI, E.; HERNANDEZ, E.R.; HURWITZ, A.; KOKIA, E.; ROSENFELD, R.G.; SCHWANDER, J.; ADASHI, E.Y. - The ovarian expression of the antigonadotropic insulin-like growth factor binding protein-2 is theca-interstitial cell-selective: evidence for hormonal regulation. **Endocrinology**, **129**: 2266-8, 1991.

ROLLAG, M.D.; PANKE, E.S.; TRAKULRINGSI, W.K., TRAKULRINGSI, C.; REITER, R.J. - Quantification of daily melatonin synthesis in the hamster pineal gland. **Endocrinol.**, **106**: 231-6, 1980.

RONNBERG, L.; KAUPPILA, A.; LEPPALUOTO, J.; MARTIKAINEN, H.; VAKKURI, O. - Circadian and seasonal variation in human preovulatory follicular fluid melatonin concentration. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, **71**: 492-6, 1990.

SABRY, I. & REITER, R.J. - Neither prolactin nor growth hormone restore the nocturnal rise in pineal N-acetyltransferase activity or melatonin content in hypophysectomized rats. **Experientia (Basel)** **44**: 509-11, 1988.

SATO, T.; WANG, G.; HARDY, M.P.; KURITA, T.; CUNHA, G.R.; COOKE, P.S. - Role of systemic and local IGF-I in the effects of estrogen on growth and epithelial proliferation of mouse uterus. **Endocrinology**, **143**: 2673-9, 2002.

SCHAEFFER, H.J. & SIROTKIN, A.V. - Melatonin and serotonin directly regulate oxytocin, insulin-like growth factor-I and progesterone secretion by cultured human granulosa cells. **Adv. Exp. Med. Biol.**, **395**: 547-8, 1995.

SCHAEFFER, H.J. & SIROTKIN, A.V. - Melatonin and serotonin regulate the release of insulin-like growth factor-I, oxytocin and progesterone by cultured human granulosa cells. **Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes**, **105**: 109-12, 1997.

SEVAL, Y.; CAKMAK, H.; KAYISLI, U.A.; ARICI, A. - Estrogen-mediated regulation of p38 mitogen-activated protein kinase in human endometrium. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, **91**: 2349-57, 2006.

SIMÕES, M.J. - **Aspectos morfológicos e morfométricos do endométrio de ratas albinas durante as fases e subfases do estro e do diestro.** São Paulo, 1979, 93p. [Tese de Mestrado - Universidade de São Paulo - Escola Paulista de Medicina].

SIROTKIN, A.V. - Direct influence of melatonin on steroid, nonapeptide hormones, and cyclic nucleotide secretion by granulosa cells isolated from porcine ovaries. **J. Pineal Res.**, **17**: 112-7, 1994.

SIROTKIN, A.V. & SCHAEFFER, H.J. - Direct regulation of mammalian reproductive organs by serotonin and melatonin. **J. Endocrinol.**, **154**: 1-5, 1997.

SMITH, M.S.; FREEMAN, M.E.; NEILL, J.D. - The control progesterone secretion during the estrous cycle and early pseudopregnancy in the rat. Prolactin, gonatropin and steroid levels associated with rescue of the corpus luteum of pseudopregnancy. **Endocrinology**, **96**: 29-226, 1975.

SOARES, J.M.Jr.; M.J.; OSHIMA, C.T.; MORA, O.A.; DE LIMA, G.R.; BARACAT, E.C. - Pinealectomy changes rat ovarian interstitial cell morphology and decreases progesterone receptor expression. **Gynecol. Endocrinol.**, **17**: 115-23, 2003a.

SOARES, J.M. Jr.; MASANA, M.I.; ERSAHIN, C.; DUBOCOVICH, M.L. - Functional melatonin receptors in rat ovaries at various stages of the estrous cycle. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, **306**: 694-702, 2003b.

SPEROFF, L. & FRITZ, M.A. - Obesity. The physiology of adipose tissue, and the problem of obesity. In: SPEROFF, L. & FRITZ, M.A. (Eds). **Clinical Gynecologic Endocrinology and Infertility**. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, p. 779-804, 2005.

SUGDEN, D. - Melatonin biosynthesis in the mammalian pineal gland. **Experientia**, **45**: 922-932, 1989.

SUNDARAM, H.; NEWMAN-TANCREDI, A.; STRANGE, P.G. - Characterization of recombinant human serotonin 5HT_{1A} receptors expressed in Chinese hamster ovary cells. [3H]spiperone discriminates between the G-protein-coupled and -uncoupled forms. **Biochem. Pharmacol.**, **45**: 1003-9, 1993.

TAKEO, Y.; KOHNO, J.; HOKANO, M. - Ultrastructural evidence for estradiol synthesis in ovary of persistent-estrus rats exposed to continuous illumination. **Acta. Anat. (Basel)**, **127**: 161-70, 1986.

TAMARKIN, L., HOLLISTER, C.W., LEFEBURE, N.G., GOLDMAN, B.D. - Melatonin induction gonadal quiescence in pinealectomized Syrian hamsters. **Science**, **198**: 953-5, 1977.

TAN, W.C.; YAP, C.; TAN, A.S. - Clinical management of PCOS. **Acta Obstet. Gynecol. Scand.**, **80**: 689-96, 2001.

TEIXEIRA, A. A. C.; SIMÕES, M. J.; WANDERLEY-TEIXEIRA, V.; SOARES, J.M.Jr.
- Evaluation of the implantation in pinealectomized and/or submitted to the constant illumination rats. **Int. J. Morphol.**, **22**: 189-194, 2004.

TRENTINI, G.P.; GENAZZANI, A.R.; CRISCUOLO, M.; PETRAGLIA, F.; GAETANI, C.; FICARRA, G.; BIDZINSKA, B.; MIGALI, M.; GENAZZANI, A.D. - Melatonin treatment delays reproductive aging of female ray via the opiate system. **Neuroendocrinology**, **56**: 364-70, 1992.

VAUGHAN, M.K.; BUZZELL, G.R.; HOFFMAN, R.A.; MENENDEZ-PELAEZ, A.; REITER, R.J. - Insulin-like growth factor-1 in Syrian hamsters: interactions of photoperiod, gonadal steroids, pinealectomy, and continuous melatonin treatment. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, **205**: 327-31, 1994.

VOORDOUW, B.C.G.; EUSER, R.; VERDONK, R.E.R.; ALBERDA, B.T.H.; de-JONG, F.H.; DROGENDIJK, A.A.T.C.; FAUSER, B.C.J.M.; COHEN, M. - Melatonin and melatonin progestin combinations alter pituitary-ovarian function in women and can inhibit ovulation. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, **74**: 108-17, 1992.

WANG, H.S. & CHARD, T. - IGFs and IGF-binding proteins in the regulation of human ovarian and endometrial function. **J. Endocrinol.**, **161**: 1-13, 1999.

WEBLEY, G.E. & LUCK, M.R. - Melatonin directly stimulates the secretion of progesterone by human and bovine granulosa cells in vitro. **J. Reprod. Fertil.**, **78**: 711-7, 1986.

WEBLEY, G.E., LUCK, M.R., HEARN, J.P. - Stimulation of progesterone secretion by cultured human granulosa cells with melatonin and catecholamines. **J. Reprod. Fertil.**, **84**: 669-77, 1988.

WEIDENFELD, Y.; SCHMIDT, U.; NIR, I. - The effect of exogenous melatonin on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in intact and pinealectomized rats under basal and stressed conditions. **J. Pineal Res.**, **14**: 60-6, 1993.

WHITE, R.M.; KENNAWAY, D.J.; SEAMARK, R.F. - Estrogenic effects on urinary 6-sulphatoxymelatonin excretion in female rat. **J. Pineal. Res.**, **22**: 124-9, 1997.

WOO, M.M.; TAI, C.J.; KANG, S.K.; NATHWANI, P.S.; PANG, S.F.; LEUNG, P.C. - Direct action of melatonin in human granulosa-luteal cells. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, **86**: 4789-97, 2001.

WU, C.S.; LEU, S.F.; YANG, H.Y.; HUANG, B.M. - Melatonin inhibits the expression of steroidogenic acute regulatory protein and steroidogenesis in MA-10 cells. **J. Androl.**, **22**: 245-54, 2001.

WURTMAN, R.J.; AXEROLD, J.; CHU, E.W.; FISCHER, J.E. - Mediation of some effects of illumination on the rat estrous cycle by the sympathetic nervous system. **Endocrinology**, **75**: 266-72, 1964.

WURTMAN, R.J. & OZAKI, Y. - Physiological control of melatonin synthesis and secretion: mechanisms, generating rhythms in melatonin, methoxyptophol, and

arginine vasotocin levels and effects on the pineal of endogenous catecholamines, the estrous cycle, and environmental lighting. **J. Neural. Transm., Suppl.**, **13**: 59-70, 1978.

YAVARONE, M.S.; SHUEY, D.L.; SADLER, T.W.; LAUDER, J.M. - Serotonin uptake in the ectoplacental cone and placenta of the mouse. **Placenta**, **14**: 149-61, 1993.

ZELEZNIK, A.J.; LITTLE-IHRIG, L.; RAMASAWAMY, S. - Administration of insulin-like growth factor I to rhesus monkeys does not augment gonadotropin-stimulated ovarian steroidogenesis. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, **87**: 5722-9, 2002.

ZWIRSKA-KORCZALA, K.; KNIAZEWSKI, B.; OSTROWSKA, Z.; BUNTNER, B. - Influence of melatonin on rat thyroid, adrenals and testis secretion during the day. **Folia Histochem. Cytobiol.**, **29**: 19-24, 1991.

8- ANEXOS

Espessura do epitélio de revestimento do útero

CONTROLE	SHAM	PNTX	PNTX+MEL	LUZ	LUZ+MEL
120,00	19,00	8,00	40,00	1,00	40,00
90,00	153,00	256,00	276,00	177,00	232,00
164,00	61,00	197,00	92,00	284,00	197,00
95,00	45,00	274,00	287,00	257,00	271,00
95,00	97,00	245,00	245,00	55,00	45,00
97,00	191,00	58,00	67,00	103,00	267,00
160,00	85,00	143,00	91,00	276,00	55,00
215,00	40,00	276,00	65,00	182,00	262,00
60,00	65,00	192,00	260,00	287,00	70,00
65,00	172,00	287,00	215,00	245,00	67,00
170,00	90,00	245,00	60,00	280,00	171,00
90,00	87,00	67,00	65,00	215,00	256,00
87,00	176,00	191,00	70,00	58,00	220,00
36,00	56,00	65,00	60,00	63,00	120,00
34,00	159,00	365,00	87,00	280,00	59,00
87,00	68,00	65,00	366,00	245,00	99,00
58,00	54,00	182,00	134,00	67,00	230,00
30,00	36,00	80,00	187,00	366,00	50,00
79,00	39,00	67,00	58,00	94,00	75,00
91,00	33,00	320,00	61,00	137,00	55,00
96,2*	86,3*	179,0*	139,0*	183,6*	142,1*
10,9♦	12,1♦	23,3♦	22,3♦	23,3♦	20,1♦

* Média

♦ Erro-padrão

Espessura do epitélio luminal

CONTROLE	SHAM	PNTX	PNTX+MEL	LUZ	LUZ+MEL
10,00	16,00	14,00	18,00	13,00	3,0
9,00	4,00	18,00	15,00	8,00	4,00
6,00	3,00	13,00	8,00	4,00	21,00
3,00	6,00	8,00	5,00	11,00	17,00
7,00	18,00	7,00	15,00	9,00	4,00
8,00	13,00	11,00	9,00	16,00	27,00
3,00	5,00	9,00	19,00	22,00	4,00
7,00	3,00	11,00	5,00	9,00	27,00
6,00	9,00	22,00	4,00	12,00	13,00
8,00	2,00	9,00	8,00	19,00	3,00
6,00	11,00	12,00	5,00	7,00	11,00
7,00	3,00	11,00	4,00	10,00	3,00
5,00	4,00	7,00	3,00	12,00	5,00
4,00	5,00	10,00	4,00	7,00	3,00
9,00	3,00	12,00	12,00	20,00	5,00
5,00	2,00	7,00	5,00	26,00	3,00
4,00	4,00	20,00	4,00	3,00	4,00
3,00	3,00	11,00	2,00	11,00	15,00
4,00	9,00	13,00	4,00	6,00	2,00
5,00	3,00	12,00	5,00	16,00	4,00
6,0*	6,3*	11,9*	7,0*	12,1*	8,9*
0,5♦	1,1♦	0,9♦	1,2♦	1,4♦	1,9♦

* Média

♦ Erro-padrão

Espessura Miometrial

CONTROLE	SHAM	PNTX	PNTX+MEL	LUZ	LUZ+MEL
16,00	82,00	571,00	26,00	621,00	551,00
551,00	314,00	98,00	23,00	49,00	41,00
16,00	398,00	39,00	19,00	345,00	43,00
12,00	161,00	587,00	522,00	187,00	321,00
621,00	12,00	84,00	13,00	682,00	14,00
14,00	15,00	118,00	9,00	881,00	67,00
12,00	521,00	128,00	859,00	47,00	44,00
11,00	13,00	67,00	16,00	118,00	12,00
12,00	9,00	799,00	13,00	128,00	658,00
890,00	726,00	353,00	201,00	67,00	163,00
13,00	16,00	31,00	210,00	789,00	345,00
11,00	14,00	321,00	13,00	353,00	287,00
12,00	14,00	342,00	12,00	747,00	212,00
13,00	11,00	521,00	434,00	547,00	438,00
15,00	13,00	217,00	19,00	123,00	19,00
16,00	12,00	234,00	255,00	55,00	255,00
772,00	434,00	726,00	11,00	543,00	211,00
12,00	19,00	30,00	16,00	435,00	16,00
12,00	14,00	213,00	454,00	47,00	57,00
13,00	17,00	323,00	43,00	38,00	48,00
152,0*	140,8*	290,1*	158,4*	340,1*	190,1*
65,2♦	48,2♦	53,2♦	52,8♦	65,2♦	43,2♦

* Média

♦ Erro-padrão

Número de Eosinófilos

CONTROLE	SHAM0	PNTX	PNTX+MEL	LUZ	LUZ+MEL
31,00	14,00	63,00	10,00	62,00	25,00
23,00	34,00	34,00	5,00	60,00	15,00
40,00	23,00	53,00	4,00	37,00	11,00
23,00	32,00	32,00	6,00	41,00	27,00
12,00	20,00	69,00	11,00	56,00	64,00
34,00	34,00	34,00	7,00	41,00	34,00
23,00	41,00	46,00	104,00	49,00	21,00
32,00	16,00	57,00	8,00	69,00	10,00
20,00	37,00	38,00	7,00	56,00	21,00
34,00	27,00	47,00	10,00	55,00	13,00
12,00	18,00	53,00	21,00	61,00	87,00
16,00	17,00	72,00	13,00	53,00	84,00
12,00	45,00	47,00	97,00	64,00	75,00
27,00	31,00	45,00	93,00	59,00	67,00
13,00	13,00	31,00	92,00	70,00	66,00
14,00	14,00	51,00	97,00	62,00	51,00
21,00	31,00	47,00	5,00	52,00	39,00
23,00	19,00	31,00	3,00	54,00	92,00
47,00	23,00	51,00	5,00	56,00	34,00
33,00	29,00	81,00	4,00	71,00	48,00
24,5*	25,9*	49,1*	30,1*	56,4*	44,2*
2,3♦	2,1♦	3,2♦	8,9♦	2,1♦	6,1♦

* Média

♦ Erro-padrão

Espessura do epitélio de revestimento do ovário

CONTROLE	SHAM	PNTX	PNTX+MEL	LUZ	LUZ+MEL
5,70	6,00	7,80	0,80	20,40	0,10
7,00	7,00	11,10	18,50	21,00	55,30
9,00	5,00	11,80	0,20	18,30	0,20
6,00	3,90	12,60	1,20	17,80	0,20
7,00	2,60	6,00	0,50	27,40	0,10
5,00	2,80	7,00	0,50	13,50	0,10
5,00	12,00	13,20	1,80	12,00	0,30
3,00	11,80	7,70	0,50	11,80	0,10
2,00	12,60	14,00	21,50	12,60	40,40
1,00	6,00	19,60	8,00	6,00	0,10
1,00	7,00	14,00	9,00	23,00	58,4
6,00	3,20	11,00	19,80	28,00	0,10
3,00	2,70	5,90	1,00	9,00	0,40
4,00	11,20	12,00	18,30	11,00	0,10
8,00	2,70	11,00	17,80	23,00	14,00
9,00	3,90	6,00	30,60	14,00	58,00
10,00	1,90	12,00	1,30	19,60	0,20
7,00	1,10	5,00	1,30	14,00	0,50
8,00	8,00	6,00	0,60	11,00	0,10
6,00	13,00	11,00	0,70	7,90	0,10
5,7*	6,2*	10,2*	7,7*	16,1*	11,4*
0,6♦	0,9♦	0,8♦	2,2♦	1,4♦	4,9♦

* Média

♦ Erro-padrão

Mitose

CONTROLE	SHAM	PNTX	PTX+MEL	LUZ	LUZ+MEL
20,00	21,00	60,00	39,00	30,00	75,00
45,00	19,00	41,00	38,00	49,00	41,00
12,00	27,00	39,00	43,00	65,00	19,00
10,00	32,00	49,00	41,00	61,00	49,00
11,00	28,0	65,00	30,00	50,00	15,00
41,00	12,00	61,00	47,00	61,00	81,00
39,00	20,00	30,00	40,00	53,00	30,00
23,00	45,00	71,00	42,00	68,00	91,00
12,00	23,00	73,00	10,00	56,00	93,00
12,00	22,00	45,00	12,00	56,00	45,00
30,00	25,00	56,00	41,00	48,00	56,00
14,00	41,00	56,00	39,00	66,00	66,00
27,00	41,00	48,00	23,00	63,00	48,00
25,00	23,00	41,00	12,00	56,00	6,00
22,00	25,00	41,00	11,00	65,00	41,00
29,00	10,00	16,00	25,00	54,00	24,00
31,00	30,00	49,00	43,00	46,00	13,00
26,00	14,00	58,00	39,00	63,00	56,00
29,00	27,00	52,00	23,00	51,00	32,00
31,00	32,00	31,00	12,00	67,00	3,00
24,5*	25,9*	49,1*	30,5*	56,4*	44,2*
2,3♦	2,1♦	3,2♦	2,9♦	2,1♦	6,1♦

* Média

♦ Erro-padrão

Células Intersticiais

CONTROLE	SHAM	PNTX	PNTX+MEL	LUZ	LUZ+MEL
221,00	182,00	400,00	582,00	211,00	115,00
67,00	145,00	178,00	145,00	222,00	123,00
28,00	98,00	230,00	8,00	195,00	504,00
365,00	79,00	289,00	9,00	230,00	198,00
112,00	80,00	400,00	10,00	289,00	189,00
140,00	152,00	115,00	2,00	220,00	102,00
120,00	140,00	123,00	10,00	289,00	222,00
190,00	150,00	504,00	680,00	223,00	184,00
14,00	194,00	198,00	14,00	329,00	490,00
105,00	14,00	189,00	7,00	198,00	394,00
302,00	105,00	102,00	13,00	224,00	182,00
191,00	230,00	222,00	25,00	193,00	212,00
114,00	191,00	184,00	14,00	222,00	333,00
424,00	132,00	520,00	638,00	208,00	78,00
11,00	380,00	394,00	311,00	437,00	105,00
110,00	44,00	182,00	9,00	364,00	87,00
19,00	72,00	212,00	378,00	192,00	432,00
200,00	230,00	587,00	300,00	194,00	119,00
179,00	126,00	478,00	11,00	172,00	234,00
132,00	72,50	312,00	2,00	190,00	79,00
152,0*	140,8*	290,0*	158,4*	240,1*	219,1*
25,2♦	18,2♦	33,2♦	52,8♦	15,2♦	30,8♦

* Média

♦ Erro-padrão

Mitose em Folículos

CONTROLE	SHAM	PNTX	PNTX+MEL	LUZ	LUZ+MEL
12,00	53,00	159,00	61,00	91,00	19,00
41,00	61,00	67,00	65,00	111,00	51,00
15,00	85,00	106,00	35,00	92,00	96,00
34,00	19,00	96,00	71,00	111,00	59,00
56,00	101,00	61,00	76,00	92,00	93,00
71,00	76,00	91,00	59,00	107,00	57,00
8,00	59,00	92,00	81,00	91,00	31,00
55,00	91,00	161,00	57,00	109,00	92,00
76,00	57,00	92,00	51,00	89,00	45,00
59,00	31,00	77,00	62,00	96,00	07,00
61,00	92,00	81,00	55,00	119,00	67,00
65,00	45,00	99,00	87,00	91,00	50,00
46,00	97,00	89,00	67,00	95,00	14,00
10,00	67,00	74,00	65,00	115,00	15,00
67,00	12,00	107,00	56,00	120,00	21,00
17,00	8,00	130,00	89,00	124,00	24,00
15,00	18,00	79,00	67,00	120,00	49,00
65,00	10,00	124,00	56,00	120,00	34,00
71,00	88,00	76,00	60,00	136,00	24,20
49,00	32,00	81,00	50,00	99,00	26,40
44,7*	55,1*	97,1*	63,5*	106,4*	48,2*
5,3♦	7,1♦	6,2♦	2,9♦	3,1♦	6,3♦

* Média

♦ Erro-padrão

6 - sulfatoximelatonina urinária

CONTROLE	SHAM	PNTX	PNTX+MEL	LUZ	LUZ+MEL
15,00	19,00	8,00	40,00	1,00	40,00
28,00	60,00	0,50	86,00	0,50	81,00
41,00	41,00	7,50	36,00	0,50	17,00
54,00	14,00	15,00	28,00	0,10	15,00
15,00	23,00	11,00	29,00	2,00	83,00
19,00	13,00	0,01	30,00	0,20	67,00
31,00	28,00	0,01	31,00	0,80	50,00
12,00	19,00	0,01	32,00	1,00	10,00
27,00	30,00	7,00	34,00	1,00	15,00
14,00	15,00	8,80	51,00	1,00	29,00
15,00	29,00	6,00	7,00	0,70	19,00
44,00	55,00	0,01	16,00	0,40	16,00
30,00	15,00	0,01	37,00	0,50	10,00
45,00	56,00	0,01	49,00	0,10	13,00
19,00	29,00	0,01	15,00	0,10	79,00
45,00	18,00	0,01	48,00	0,30	16,00
15,00	14,00	0,20	30,00	0,60	5,00
17,00	11,00	0,01	36,00	0,60	10,00
9,00	22,00	0,01	40,00	0,40	20,00
11,00	33,00	0,01	61,00	0,20	15,00
25,3*	27,2*	3,2*	36,8*	0,6*	30,5*
3,1♦	3,4♦	1,1♦	3,8♦	0,1♦	5,9♦

* Média

♦ Erro-padrão

IGF-I

CONTROLE	SHAM	PNTX	PNTX+MEL	LUZ	LUZ+MEL
307,48	586,62	119,13	229,69	381,23	472,45
308,84	441,35	154,33	178,59	171,29	194,06
377,16	510,96	119,26	164,94	148,90	357,65
479,08	247,58	228,47	460,82	119,82	181,14
459,44	633,37	219,00	492,14	60,15	226,48
457,06	812,00	200,00	496,87	307,92	424,73
396,06	183,45	210,56	479,63	53,72	120,34
442,03	143,00	290,00	492,42	78,58	136,50
413,77	217,94	400,00	496,56	354,80	428,47
353,77	414,81	220,21	496,50	270,95	266,56
400,00	414,81	348,00	477,49	108,03	159,51
513,77	454,81	165,72	487,00	256,70	175,14
443,77	434,00	176,29	490,00	402,36	171,77
493,77	434,81	302,46	472,42	527,80	326,55
413,77	414,81	122,00	472,42	54,56	353,24
323,77	424,81	104,00	492,42	116,19	413,30
513,77	524,81	109,00	482,42	98,49	276,00
416,00	514,81	104,00	502,00	346,08	265,00
322,00	234,81	112,00	492,00	436,33	273,00
440,00	453,00	190,00	491,00	30,60	274,00
413,8*	424,8*	194,7*	442,4*	216,2*	274,8*
14,6♦	36,1♦	19,1♦	22,4♦	33,9♦	23,8♦

* Média

♦ Erro-padrão

Estradiol

CONTROLE	SHAM	PNTX	PNTX+MEL	LUZ	LUZ+MEL
97,90	69,93	59,00	69,69	126,65	80,90
66,10	143,30	107,40	98,59	106,92	74,70
87,00	60,80	114,90	104,94	106,92	94,60
103,20	66,30	108,20	120,82	144,20	81,14
97,00	69,93	90,10	92,14	118,50	77,20
64,50	85,60	198,00	51,00	189,90	82,40
29,00	135,20	74,80	203,60	130,76	89,60
103,21	38,70	85,40	67,50	130,76	72,30
33,00	49,60	91,20	110,90	130,76	98,10
83,21	32,00	60,60	52,90	117,85	70,30
88,00	89,00	84,20	48,20	108,00	179,20
62,00	167,00	122,50	50,00	126,62	173,00
63,21	109,00	112,00	104,90	130,00	79,50
31,21	31,00	108,00	67,60	108,00	75,80
104,00	107,00	92,20	60,40	130,76	91,10
30,00	37,00	106,92	56,50	130,00	97,00
97,00	110,00	106,92	72,30	131,00	132,00
103,21	35,00	184,40	112,60	117,85	114,00
28,00	99,00	180,00	79,60	127,85	94,48
93,21	98,00	106,92	61,80	106,92	89,00
73,2*	81,7*	109,7*	84,3*	124,9*	97,3*
6,5♦	8,9♦	8,4♦	8,2♦	4,2♦	6,9♦

* Média

♦ Erro-padrão

Progesterona

CONTROLE	SHAM	PNTX	PNTX+MEL	LUZ	LUZ+MEL
12,00	11,00	1,60	15,00	2,10	3,20
39,92	35,00	2,40	6,00	2,20	1,20
6,00	17,00	1,20	11,10	2,10	4,20
14,10	4,00	1,60	6,80	1,40	3,20
6,80	1,70	3,80	11,00	2,20	1,30
11,00	26,00	2,40	11,70	2,10	3,34
21,76	11,50	1,70	8,00	1,10	6,30
7,50	2,80	18,30	7,10	1,20	11,00
5,90	4,60	2,10	4,60	21,60	4,00
20,30	31,00	4,10	12,50	3,10	2,80
11,70	11,70	2,50	13,50	19,80	1,50
15,90	7,90	15,00	11,00	3,40	13,00
13,80	15,10	16,60	16,80	3,60	21,00
30,00	5,00	16,80	11,00	4,00	15,00
12,40	29,00	1,20	15,10	1,80	2,10
25,80	14,00	3,60	7,0	2,00	2,00
24,70	28,00	2,10	18,50	2,90	4,10
15,00	23,00	4,60	14,00	5,60	18,40
10,10	6,00	2,70	11,1	3,80	24,20
22,00	32,00	18,59	10,00	18,60	26,45
16,3*	15,8*	6,1*	11,1*	5,2*	8,4*
2,0♦	2,5♦	1,5♦	0,8♦	1,5♦	1,9♦

* Média

♦ Erro-padrão

Androgênio

CONTROLE	SHAM	PNTX	PNTX+MEL	LUZ	LUZ+MEL
106,92	82,50	78,00	89,0	80,0	50,9
96,92	60,00	98,59	88,00	91,90	71,00
86,92	80,80	134,94	103,00	74,60	64,60
105,00	79,00	115,82	121,00	91,14	81,14
112,00	80,00	126,00	82,14	70,20	80,20
99,60	98,00	93,60	93,00	95,40	85,40
45,80	105,00	123,60	103,60	89,60	69,60
93,00	54,20	79,50	69,50	98,00	97,00
94,00	102,00	97,90	87,00	99,00	78,00
105,00	82,80	92,00	98,00	91,00	90,00
75,60	79,39	102,00	54,00	125,30	65,00
65,70	99,00	96,60	45,00	88,00	89,00
114,00	87,00	83,00	89,00	91,10	33,10
56,20	125,00	98,00	98,00	86,00	78,00
71,80	102,00	81,00	90,70	96,00	74,00
110,00	77,0	91,00	73,00	94,90	87,00
65,30	112,00	82,00	34,00	98,60	32,00
95,00	93,00	91,00	32,00	99,00	89,00
80,90	126,00	79,00	74,00	108,00	78,00
132,00	72,50	82,00	92,00	170,00	79,00
90,6*	89,9*	96,3*	80,8*	96,9*	73,6*
4,9♦	4,3♦	3,8♦	5,3♦	4,6♦	3,9♦

* Média

♦ Erro-padrão